DER EINFLUSS VERSCHIEDENER PURIN- UND PYRIMIDINDERIVATE AUF DIE DURCH ALLOPURINOL INDUZIERTE OROTACIDURIE

Josef Reisinger

Diss.
München
1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554811_0019

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. N. Zöllner

DER EINFLUSS VERSCHIEDENER PURIN- UND PYRIMIDIN-DERIVATE AUF DIE DURCH ALLOPURINOL INDUZIERTE OROTACIDURIE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von:

Josef Reisinger
aus Brannenburg/Inn

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Gröbner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. N. Zöllner
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.März 1985

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Gliederung

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Allgemeiner Teil	2
2.1.	Purinstoffwechsel	2
2.1.1.	Purinbiosynthese und Abbau	2
2.1.2.	Regulation der Purinsynthese	5
2.1.3.	Reutilisation von Purinbasen	7
2.1.4.	Abbau von Pruinen	8
2.2.	Pyrimidinstoffwechsel	10
2.2.1.	Pyrimidinbiosynthese	10
2.2.2.	Umwandlung von Pyrimidinnucleotiden	12
2.2.3.	Pyrimidinreutilisation	13
2.2.4.	Regulation der Pyrimidinsynthese	13
2.2.5.	Störung des Pyrimi dinstoffwechsels	15
2.3.	Beeinflussung von Pyrimidin- und Purinstoffwechsel durch Allopurinol	17
2.3.1.	Allgemeines	17
2.3.2.	Beeinflussung des Purinstoffwechsels durch Allopurinol	18
2.3.3.	Beeinflussung des Pyrimidinstoffwechsels durch Allopurinol	21
3.	Eigene Untersuchungen	24
3.1.	Problemstellung	24
3.2.	Methodik	25
3.2.1.	Versuchspersonen und Versuchsbedingungen	25
3.2.2.	Durchführung des Versuchs	27
3.2.3.	Diät	29

		Seite
3.2.4.	Methoden	32
3.2.4.1.	Harnsäure	32
3.2.4.2.	Oxypurine	36
3.2.4.3.	Orotsäure	41
3.2.4.4.	Orotidyldecarboxylase	44
3.3.	Ergebnisse	51
4.	Diskussion	56
5.	L i t e r a t u r	65
6.	Z u s a m m e n f a s s u n g	79
7.	A n h a n g Tabellen und Abbildungen	81

1. Einleitung

Biosynthese und Abbau von Pyrimidin- und Purinnucleotiden, den Bausteinen der Desoxyribonucleinsäure und Ribonucleinsäure, gehören zu den fundamentalen, in allen Zellen verwirklichten Lebensvorgängen. Während Untersuchungen über den Purinstoffwechsel, und damit auch der Pathogenese der Gicht, bereits seit der Jahrhundertwende durchgeführt wurden, war der Pyrimidinstoffwechsel erst in den letzten 10 Jahren Gegenstand der Forschung. Dabei führten vor allem die Untersuchungen der hereditären Orotazidurie und der medikamentös bedingten Orotazidurien zu Aufschlüssen über den Pyrimidinstoffwechsel.

Zwischen der Bildung von Pyrimidin- und Purinnucleotiden sind enge Beziehungen anzunehmen, da beide in annähernd äquimolaren Mengen in die Synthese der Nucleinsäure eingehen.

Allopurinol wird seit Jahren in der Therapie der Hyperuricämie eingesetzt. Es ist ein ausgeprägter Inhibitor der Xanthinoxydase, welche die Umwandlung von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure katalysiert.

1970 wurde zum erstenmal auch eine Beeinflussung des Pyrimidinstoffwechsels durch Allopurinol gezeigt. Die Verabreichung dieses Arzneimittels führt zu einer vermehrten renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin, was auf eine Hemmung des Enzyms Orotidyldecarboxylase zurückzuführen ist.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag liefern zur Aufklärung der Regulationsmechanismen der Pyrimidinsynthese und zu der Frage der gegenseitigen Beeinflussung von Pyrimidin- und Purinstoffwechsel.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Purinstoffwechsel

2.1.1. Purinbiosynthese und Abbau

Die stufenweise Synthese des Purinskelettes erfolgt durch zehn enzymatische Reaktionsschritte (Abb. 1). Dabei wird von der ersten Reaktion an ein zunächst offenes, später ringförmiges Ribonucleotid gebildet. Ausgangsstoff ist D-Ribose-5-phosphat, welches in einer Adenosintriphosphat-abhängigen Reaktion und durch Einwirkung der Phosphoribosylpyrophosphat-Synthetase in 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (PRPP) übergeführt wird. Diese Verbindung spielt nicht nur bei der de novo Purinsynthese eine wichtige Rolle, sondern sie vermag auch aus bereits vorhandenen, teilweise durch die Nahrung zugeführten Purinbasen Purinnucleotide zu bilden. Im nächsten Reaktionsschritt entsteht durch Anlagerung einer Aminogruppe, welche vom Glutamin stammt, in die Stellung 1 des PRPP 5-Phosphoribosylamin. Diese Reaktion wird durch das Enzym PRPP-Amidotransferase katalysiert, welchem eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation der Purinsynthese zukommt (53).

In den folgenden, z. T. Adenosintriphosphat verbrauchenden Reaktionen wird der Purinring Schritt für Schritt aufgebaut. So stammen die C-Atome 4 und 5 des Purinringes sowie das N-Atom 7 vom Glycin ab. Bei den N-Atomen 3 und 9 handelt es sich um den Amidstickstoff des Glutamins, wohingegen das N-Atom 1 vom Aminostickstoff des Aspartats stammt. Die C-Atome 2 und 8 werden durch Formyl-Tetrahydrofolat bereitgestellt, das C-Atom 6 aus Kohlendioxyd (Abb.2) (49).

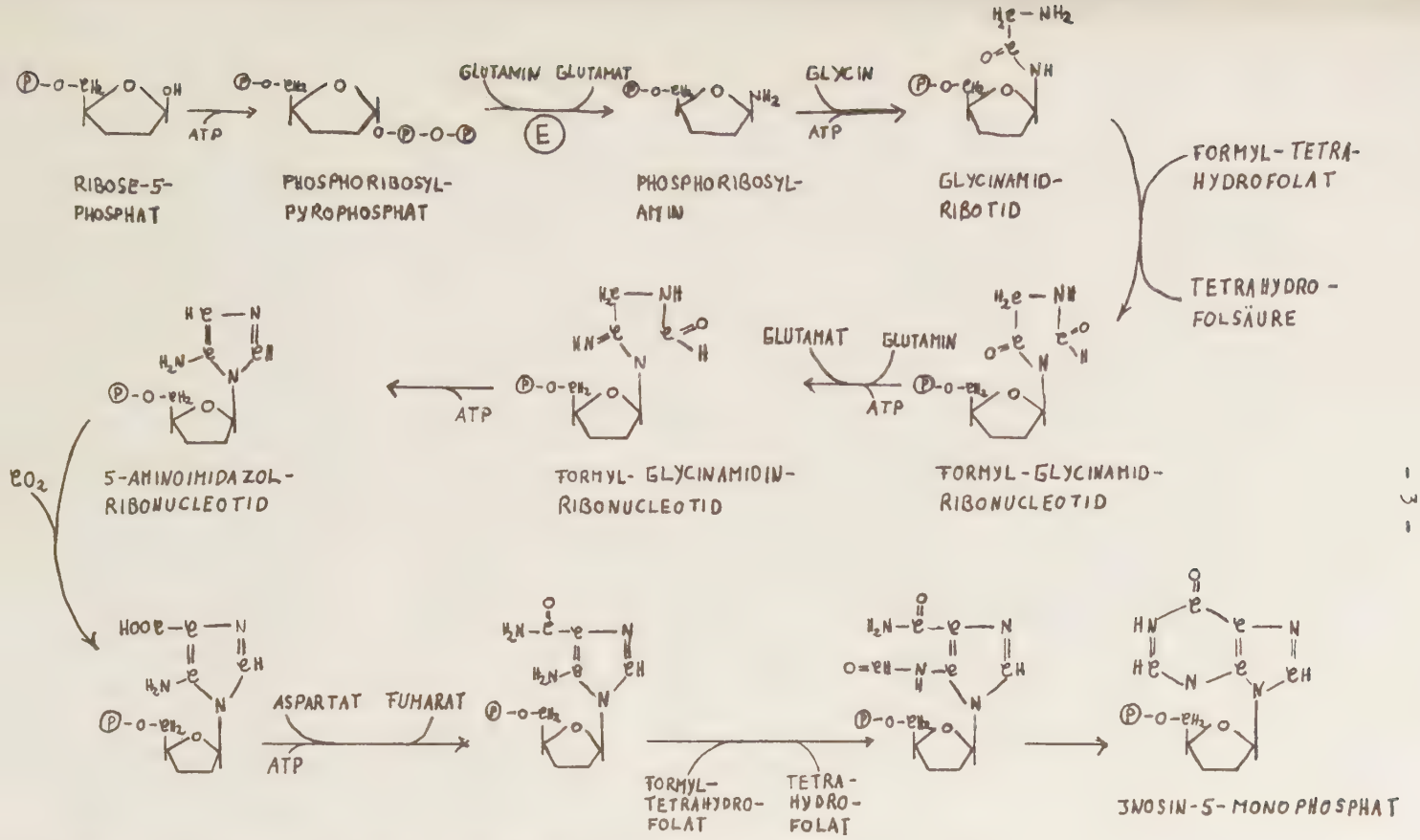


ABB. 1 PURINBIOSYNTHESE DE NOVO (nach M.M. MÜLLER et.al. 1975)

E = PRPP-AMIDOTRANSFERASE

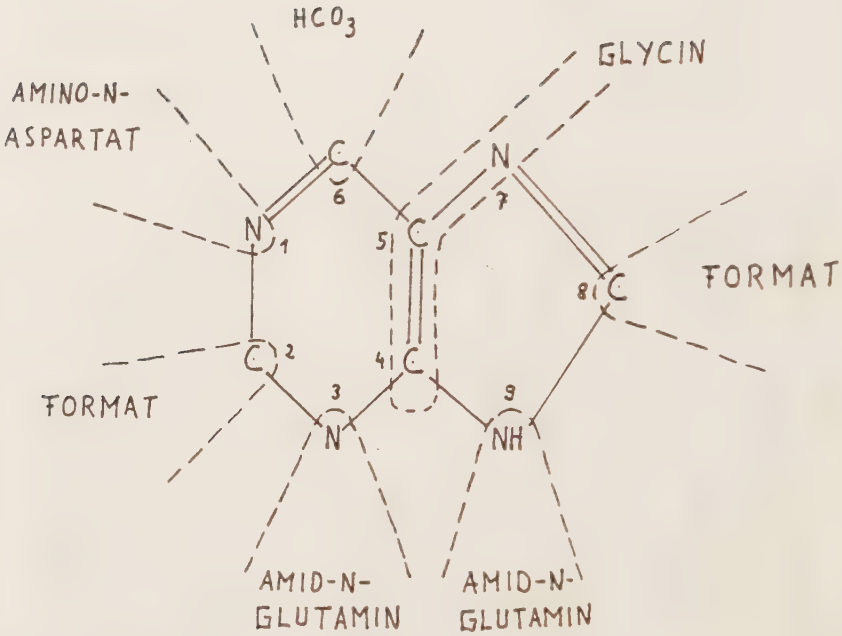


Abbildung 2:
Herkunft der Kohlenstoff- und Stickstoffatome im Purinkern
(nach Löffler 1975) (49).

Als Endprodukt der Purinsynthese entsteht die Inosinsäure (IMP), welche als Stammsubstanz für die anderen Purinnucleotide aufgefaßt werden kann, da sie sowohl zu Adenosinsäure (AMP) als auch zu Guanosinsäure (GMP) umgewandelt werden kann (Abb.3), welche wichtige Coenzyme für viele Reaktionen sind und die wichtige Bausteine der Nucleinsäuren darstellen. AMP und GMP können weiter zu den entsprechenden Di- und Triphosphaten phosphoryliert werden.

2.1.2. Regulation der Purinbiosynthese

Der von der PRPP-Amidotransferase katalysierte Reaktionsschritt, in welchem aus PRPP und Glutamin Phosphoribosylamin gebildet wird, ist für die gesamte Purinbiosynthese geschwindigkeitsbestimmend, da es bei der Synthese des Purinskelettes bei keinem der nachfolgenden Schritte zu einer Anhäufung eines der Metaboliten kommt (9, 23, 53) und keines der sie katalysierenden Enzyme durch Endprodukte in physiologischen Konzentrationen gehemmt wird (53, 55, 73). Durch die Arbeiten von Wyngaarden et al. aus dem Jahre 1968 (69, 73) wurde gezeigt, daß die Aktivität dieses Enzyms durch die Mononucleotide Adenosinmonophosphat (AMP), Guanosinmonophosphat (GMP) und Inosin-5-monophosphat (IMP) gehemmt wird.
Aus der Tatsache, daß die Hemmwirkung additiv ist, kann auf verschiedene Bindungsstellen der jeweiligen Nucleotide am Enzym geschlossen werden. Durch diese allosterische Hemmung wird die Purinbiosynthese gedrosselt, wenn ausreichende Mengen an Purinnucleotiden vorhanden sind. Von Holmes et al. (1973) wurde allerdings auch eine synergistische Hemmung von AMP und GMP beschrieben.

Des weiteren wurde herausgefunden, daß die Konzentration von PRPP in der Zelle beträchtlich unter der für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der PRPP-Amidotransferase notwendigen Konzentration liegt. Daher übt jede Änderung der PRPP-Konzentration einen unmittelbaren Einfluß auf die Purinsynthese aus (20, 53).

Ein weiterer Kontrollmechanismus findet sich auf der Stufe der Umwandlung von IMP in AMP bzw. GMP, wodurch ebenfalls die Konzentration der Nucleotide konstant gehalten werden soll. Die jeweils über zwei enzymatische Schritte ablaufende Bildung von AMP bzw. GMP aus IMP wird von den Endprodukten dieser Reaktion gehemmt, das heißt AMP und GMP kontrollieren selbst ihre Synthese aus IMP (49, 50, 70).

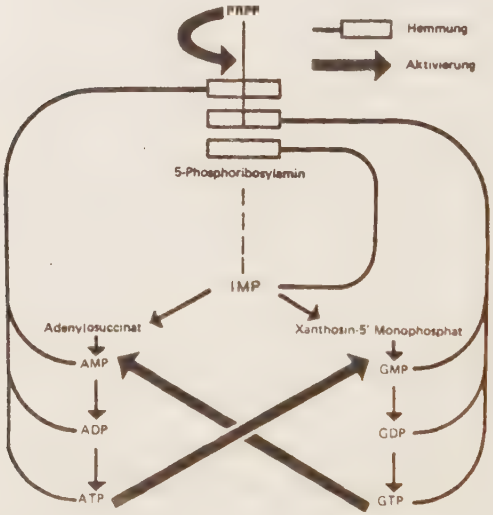


Abbildung: 2a
Regulation der Purinbiosynthese (Abb. nach G. Löffler 1975)

Außer den beschriebenen Mechanismen (siehe Text) regulieren auch die Di- und Triphosphate von Adenosin und Guanosin die Purinsynthese durch Hemmung der de novo -Synthese sowie durch Aktivierung der Synthese der jeweils anderen Nucleotide aus IMP.

2.1.3. Reutilisation von Purinbasen

Durch den intracellulären Abbau von Nucleinsäuren sowie durch enterale Resorption sammeln sich beträchtliche Mengen von Purinbasen an. Ein Teil davon wird weiter abgebaut, ein anderer Teil dagegen wird zum Wiederaufbau von Nucleotiden verwendet. Dies geschieht mit Hilfe von zwei Enzymen:

Die Adenin-Phosphoribosyl-Transferase (APRT) führt Adenin in einer PRPP-abhängigen Reaktion in Adenosin-5-monophosphat über, die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) verwandelt Hypoxanthin und Guanosin in die entsprechenden Nucleotide (49, 54).

2.1.4. Abbau von Purinen

Der Abbau von Purinen erfolgt nach einer anderen Reaktionssequenz als die Biosynthese. Ausgehend von den Purinribosiden Adenosin, Inosin, Xanthosin und Guanosin startet der biologische Abbau mit einer Umwandlung der verschiedenen Purine zu Xanthin. Der letzte Schritt vom Xanthin zur Harnsäure wird schließlich ebenso wie derjenige von Hypoxanthin zu Xanthin durch das Enzym Xanthinoxydase katalysiert (54).

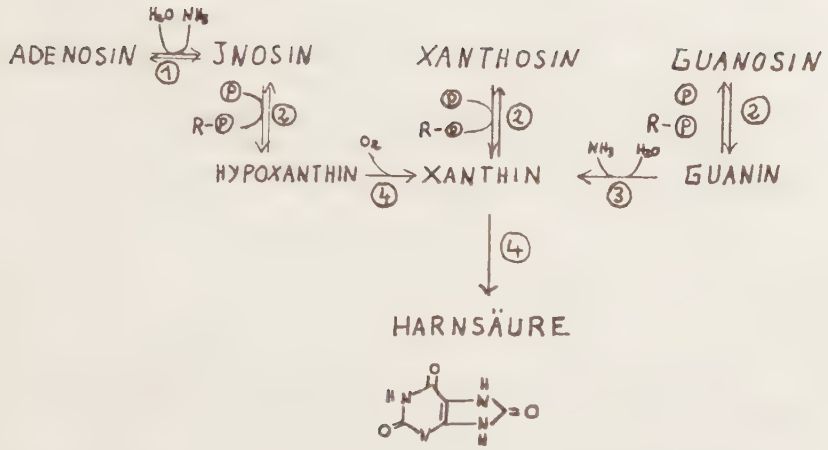


ABB 3: ABBAU DER PURINE (nach Löffler, 1975)

① = ADENOSINDESAMINASE ② = NUCLEOSID-PHOSPHORYLASE
③ = GUANASE ④ = XANTHINOXYDASE

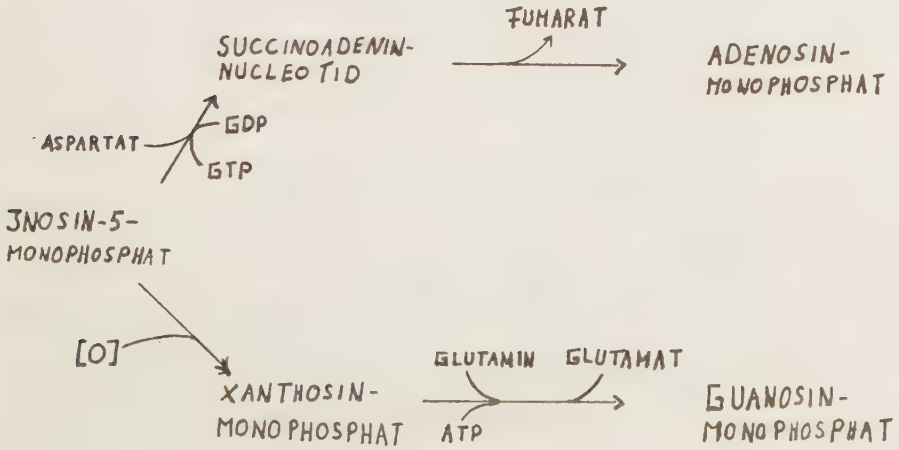


ABB. 4: BIOSYNTHESE VON AMP UND GMP
(nach Löffler, 1975)

2.2. Pyrimidinstoffwechsel

Die Synthese von Pyrimidinnucleotiden wurde zuerst in Bakterien, anschließend auch im Säugetierorganismus untersucht. Pyrimidinnucleotide können wie Purinnucleotide entweder de novo oder durch Reutilisation von Basen oder Ribonucleosiden gebildet werden (11, 22, 30, 52, 66, 74).

2.2.1. Pyrimidinbiosynthese

Ausgangsstoff der Pyrimidinbiosynthese ist das Carbamylphosphat (CAP). Es entsteht in einer ATP-verbrauchenden Reaktion aus Glutamin und CO_2 (Abb. 6). Als Katalysator dient dazu die Carbamylphosphatsynthetase (CAPS). Zahlreiche Untersuchungen zeigten, daß im Säugetierorganismus zwei verschiedene Carbamylphosphatsynthetasen existieren (36, 42, 45). Während das eine Enzym (CAPS I), das in den Mitochondrien der Leber gefunden wird und Ammonium als Stickstoffquelle benützt, für die Citrullinsynthese verantwortlich zu sein scheint, besitzt die andere Carbamylphosphatsynthetase (CAPS II) eine hohe Affinität zu Glutamin als Stickstoffquelle, obwohl auch Ammonium als Substrat dienen kann, das bei vermehrter Ammoniaksynthese in die Pyrimidinsynthese eingeschleust wird. Das durch Glutamin stimulierbare Enzym (CAPS II) ist für die Pyrimidinsynthese de novo verantwortlich (28, 35, 46).

Die CAPS II ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Pyrimidinsynthese. Aus Carbamylphosphat entsteht unter Mitwirkung der Aspartattranscarbamylase Carbamylaspartat. Der Pyrimidinring wird durch die reversible Dehydrierung von Carbamylaspartat zu Dihydroorotsäure gebildet. Die Synthese von Dihydroorotsäure erfolgt mittels Dihydroorotase, der nächste Schritt zur Orotsäure wird durch die Dihydroorotsäuredehydrogenase katalysiert.

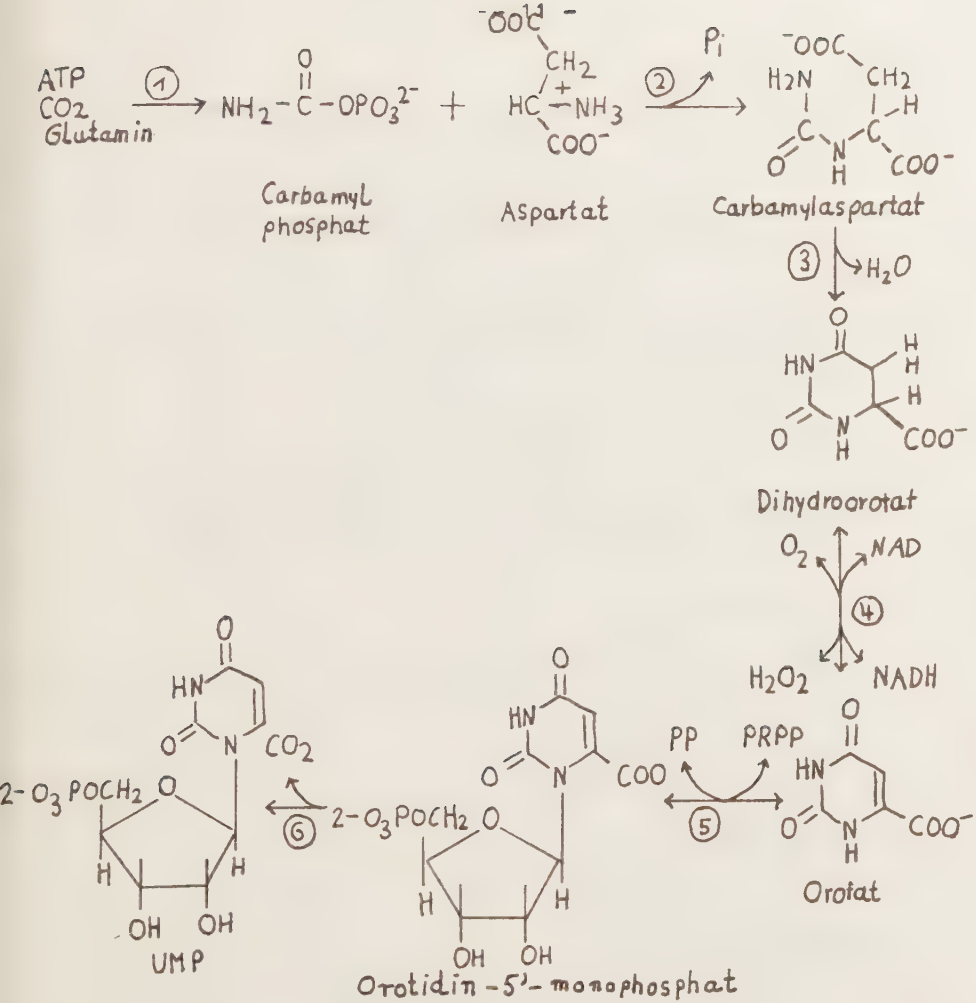


ABB.5: PYRIMIDYNBIOSYNTHESE DE NOVO (nach KELLEY 1972)

① = CARBAMYLPHOSPHATSYNTHETASE
② = ASPARTAT-TRANSCARBAMYLASE
③ = DIHYDROOROTASE
④ = DIHYDROOROTSÄURE-DEHYDROGENASE
⑤ = OROTATPHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE
⑥ = OROTIDYLDECARBOXYLASE

Aus Orotsäure, dem eigentlichen Endprodukt der Pyrimidinsynthese, und PRPP wird durch die Orotatphosphoribosyltransferase das erste Pyrimidinnucleotid, Orotidin-5-monophosphat, gebildet. Durch Decarboxylierung wird Orotidin-5-monophosphat schließlich in Uridin-5-monophosphat überführt, wobei als Katalysator die Orotidyldecarboxylase (ODC) dient. Dabei sind die Enzyme Orotatphosphoribosyltransferase und ODC wahrscheinlich als Enzymkomplex auf einem Protein lokalisiert (25).

2.2.2. Umwandlung von Pyrimidinnucleotiden

Die Pyrimidinribonucleosidmonophosphate können durch verschiedene Enzyme zu Di- und Triphosphaten phosphoryliert werden (Abb. 6).

Uridinmonophosphat kann mittels ATP zu Uridindi- und Uridintriphosphat umgewandelt werden. Aus Uridintriphosphat kann dann in Gegenwart von ATP und Mg^{++} sowie Glutamin oder Ammoniak Cytidin-5-triphosphat gebildet werden, wobei als Katalysator die Cytidin-5-triphosphatsynthetase dient.

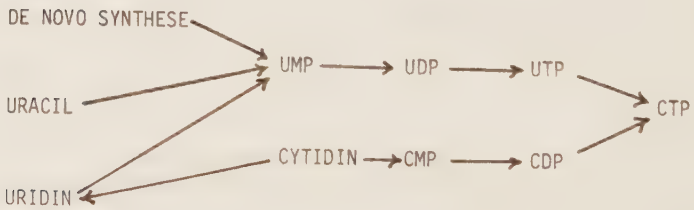


Abbildung 6

Umwandlung von Pyrimidinnucleotiden (nach Kelley 1972)

2.2.3. Pyrimidinreutilisation

Die Ribonucleotide von Uracil, Thymin und Cytosin können auch aus den vorgebildeten Basen synthetisiert werden (29).

Uracil kann sowohl direkt zu dem entsprechenden Nucleotid umgewandelt werden, wobei als Enzym Orotatphosphoribosyltransferase dient (58), als auch zuerst in ein Ribosid und anschließend in das Ribotid überführt werden. So wird Uracil durch die Uridinphosphorylase in Gegenwart von Ribose-1-phosphat zu Uridin umgewandelt. Uridin wird in Gegenwart von ATP und Uridinkinase zu Uridin-5-monophosphat phosphoryliert. Die Uridinkinase kann auch Cytidin als Substrat verwenden (40).

2.2.4. Regulation der Pyrimidinsynthese

Bei Säugetieren stellt die Carbamylphosphatsynthetase II (CAPS II) das erste spezifische Enzym der Pyrimidinsynthese dar (12, 36, 78). In vitro Untersuchungen ergaben, daß dieses Enzym durch Uridintriphosphat inhibiert (33, 48) und durch PRPP aktiviert wird (67). Weitere Kontrollmöglichkeiten des Pyrimidinstoffwechsels bei Säugetieren betreffen das Enzym Dihydroorotase, das durch eine Reihe von Purinen und Pyrimidinen inhibiert wird, sowie die ODC , die durch Uridinmonophosphat gehemmt wird (Abb.8)(25).

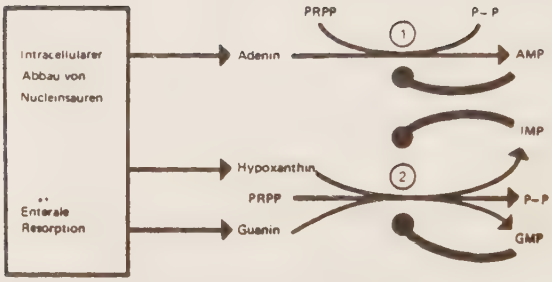


Abbildung 7:

Purinreutilisation (nach Löffler, 1975)

1 = Adenin - Phosphoribosyl - Transferase

2 = Hypoxanthin - Guanin - Phosphoribosyl - Transferase

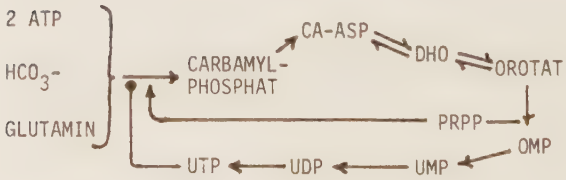


Abbildung 8:

Regulation der Pyrimidinsynthese (nach Löffler, 1975)

2.2.5. Störungen des Pyrimidinstoffwechsels

Hereditäre Orotazidurie (Typ I und II)

Die hereditäre Orotazidurie ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte Erkrankung des Pyrimidinstoffwechsels, die mit einer megaloblastären Anämie, Leukopenie, Wachstums- und Entwicklungsverzögerung sowie einer excessiven Ausscheidung von Orotsäure einhergeht.
Bei der häufigsten Form, dem Typ I, bestehen eine ausgeprägte Verminderung der Aktivitäten der Orotidyldecarboxylase (ODC) und der Orotatphosphoribosyltransferase, also ein Doppelenzymdefekt (59, 60, 65).

Beim Typ II der Erkrankung fand sich lediglich ein Fehlen der ODC (17). Die excessive Orotsäureausscheidung im Urin bei Patienten mit dieser Erkrankung beruht vermutlich nicht nur auf einer Hemmung der Umwandlung von Orotsäure zu Uridin-5-Monophosphat, sondern auch auf einer gesteigerten Pyrimidinsynthese de novo, die auf eine verminderte Endproduktbemmung zurückzuführen ist. Die klinischen Erscheinungen dürften die Folge eines Mangels an Pyrimidinnucleotiden sein, die endogen nicht in ausreichender Menge gebildet werden können.

Uridintherapie führt bei Patienten mit hereditärer Orotazidurie zu einer kompletten hämotologischen Remission (6). Die renale Ausscheidung von Orotsäure nimmt deutlich ab (5, 34), was auf die Existenz eines Feed-back-Mechanismus beim Menschen hinweist. Absetzen der Uridinbehandlung geht mit einem Wiederauftreten der klinischen Manifestationen einher (65).

Orotacidurie infolge Fehlens der Ornithin-Transcarbamylase-Aktivität

Eine erhöhte Ausscheidung von Orotsäure, Uracil und Uridin ist bei Kindern mit Ornithin-Transcarbamylase-Mangel beschrieben worden (49, 51). Die erhöhte Pyrimidinsynthese wird bei dieser Erkrankung auf die Akkumulation von Carbamylphosphat (infolge des Blocks in der Citrullinsynthese) zurückgeführt, das als Substrat für Aspartat-Transcarbamylase dient (47).

2.3. Beeinflussung von Pyrimidin- und Purinstoffwechsel durch Allopurinol

2.3.1. Allgemeines

Allopurinol, ein Isomer von Hypoxanthin, wurde zuerst synthetisiert, um die durch Xanthinoxydase katalysierte Oxydation des Chemotherapeutikums 6-Mercaptopurin zu der inaktiven 6-Thioharnsäure zu hemmen (15). Dabei wurde beim Einsatz von 6-Mercaptopurin und Allopurinol bei Leukämiepatienten mit Hyperuricämie ein ausgeprägter Abfall der Serumharnsäure sowie der renalen Harnsäureausscheidung beobachtet (61). Diese harnsäuresenkende Wirkung von Allopurinol führte zum Einsatz dieses Arzneimittels in der Gichtbehandlung (14, 43, 62, 64, 71, 72, 75).

Allopurinol wird rasch aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert und ist im Plasma etwa 30 - 60 Minuten nach oraler Verabreichung nachweisbar. Der größte Anteil wird in vivo zu Oxypurinol oxydiert, ein kleiner Teil zu Allopurinolribonucleosid und dem entsprechenden Ribonucleotid umgewandelt (44). Auch Oxypurinol wird zu einem kleinen Teil in 7-N-ribosyloxypurinol (Oxypurinol-1-ribonucleosid) und 1-N-ribosyloxypurinol wie auch zu den Nucleotiden umgewandelt (2, 3).

Die Ausscheidung von Allopurinol erfolgt zu 3 - 10 % unverändert im Urin und zu 20 % in den Faeces. Oxypurinol wird unverändert im Urin ausgeschieden. Seine biologische Halbwertzeit beträgt 28 Stunden (16).

2.3.2. Beeinflussung des Purinstoffwechsels durch Allopurinol

Infolge der Hemmung der Xanthinoxydase kommt es unter Allopurinol zu einem Abfall der Serumharnsäure und renalen Harnsäureausscheidung bei gleichzeitigem Anstieg der Ausscheidung von Hypoxanthin und Xanthin im Urin. Bei den meisten Patienten wird jedoch die Verringerung der renalen Harnsäureausscheidung nicht durch die vermehrte Oxypurinelimination ersetzt (14, 24, 31, 61, 64, 76). Dies legt die Vermutung nahe, daß Allopurinol auch die Purinsynthese de novo beeinflußt.

Folgende Mechanismen kommen dafür in Frage:

1. Allopurinolribonucleotid könnte direkt das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Purinsynthese de novo, nämlich die PRPP-Amidotransferase, hemmen.

   In vitro stellt Allopurinolribonucleotid einen Inhibitor der PRPP-Amidotransferase von Taubenleber dar (12).
   Holmes und Mitarbeiter (1973) konnten ebenfalls in vitro zeigen, daß auch die PRPP-Amidotransferase des Menschen durch Allopurinolribonucleotid gehemmt wird (32).

2. Aufgrund des Hypoxanthinanstiegs unter Allopurinoltherapie kommt es durch Reutilisierung zu einer vermehrten Bildung von Inosin-5-monophosphat (IMP). IMP sowie die daraus entstehenden Adenin- und Guaninnucleotide sind allosterische Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase (10, 32, 41).

   Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstrichen, daß Allopurinol bei Mäusen die Reutilisation von Hypoxanthin und Xanthin für die Nucleinsäuresynthese steigert (56, 57) und auch beim Menschen die Wiederverwertung von exogenem Hypoxanthin erhöht (63).

3. Die vermehrte Umwandlung von Allopurinol oder Hypoxanthin zu den entsprechenden Ribonucleotiden könnte zu einer Reduktion der intracellulären Konzentration von PRPP, einem Substrat der PRPP-Amidotransferase, und auf diesem Weg zu einer verminderten Purinsynthese de novo führen. Fox und Mitarbeiter (1970) konnten zeigen, daß die orale Gabe von Allopurinol beim Menschen innerhalb von drei bis fünf Stunden zu einem Abfall der PRPP-Konzentration im Erythrozyten führt (19). Dieser Effekt ist nicht auf eine vermehrte Reutilisation von Hypoxanthin und Xanthin zurückzuführen, da Erythrozyten keine Xanthinoxydase besitzen (19). Die Autoren erklären deshalb die Reduktion der intracellulären PRPP-Konzentration durch Allopurinol mit der Bildung von Allopurinolribonucleotid.

Bei allen drei Mechanismen spielt das Enzym Hypoxanthin-guaninphosphoribosyltransferase (HGPRT), welches die Ribonucleotidbildung katalysiert, eine entscheidende Rolle. So konnten Kelley und Mitarbeiter (1968) zeigen, daß bei Patienten mit verminderter HGPRT-Aktivität Allopurinol zu keiner Beeinflussung der Purinsynthese de novo führt (37).

Untersuchungen von Zöllner und Gröbner (1970) erbrachten eine weitere Hypothese zur Erklärung des Purindefizits nach Allopurinolgabe (76). Sie stellten fest, daß Allopurinol die endogene Harnsäurebildung nur um etwa 50 % reduziert, während die Harnsäurebildung aus exogenen Purinen fast vollständig unterdrückt wird. Da das Enzym Xanthinoxydase vor allem in der Leber und im Dünndarm gebildet wird, könnte die Elimination der exogenen Uratquote auf einer Anreicherung von Allopurinol im Dünndarmepithel beruhen. Ob diese Verminderung der exogenen Uratquote durch die Ausscheidung entsprechender Mengen von Oxypurinen kompensiert wird, dürfte dann in erster Linie davon abhängen, ob diese Verbindungen, nachdem sie sich vor dem Mucosablock anhäufen, vornehmlich in das Interstitium mit anschließender Verteilung, auch in das Plasma, oder in das Darmlumen diffundieren, mit nachfolgendem bakteriellem Abbau.

2.3.3. Beeinflussung des Pyrimidinstoffwechsels durch Allopurinol

In mehreren Untersuchungen wurde festgestellt, daß es unter Allopurinoltherapie zu einem Anstieg der renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin kommt (18, 38, 78).

Dieser Anstieg ist auf eine Hemmung des Enzyms Orotidyldecarboxylase (ODC) zurückzuführen, das für die Umwandlung von Orotidin-5-monophosphat zu Uridin-5-monophosphat verantwortlich ist. Es wird angenommen, daß ODC und Orotatphosphoribosyltransferase (OPRT), welche die Synthese von Orotidin-5-monophosphat aus Orotsäure und PRPP katalysiert, einen Enzymkomplex bilden.

Untersuchungen von Kelley und Beardmore (1970) ergaben, daß Xanthosin-5-monophosphat und Allopurinolribonucleotid ausgeprägte Inhibitoren der ODC darstellen (38). Da beide Ribonucleotide aus ihren Basen in Gegenwart von PRPP und Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase (HGPRT) synthetisiert werden, wurde zuerst angenommen, daß die Hemmung der Pyrimidinsynthese durch Allopurinol nur bei Personen mit normaler HGPRT-Aktivität möglich ist. Die Beobachtung, daß auch Patienten mit Lesh-Nyhan-Syndrom (Fehlen der HGPRT) nach Verabreichung von Allopurinol eine vermehrte renale Ausscheidung von Orotidin und Orotsäure aufweisen (1), war jedoch mit dieser Hypothese nicht in Einklang zu bringen. Weitere Untersuchungen ergaben, daß zwei Oxypurinolribonucleotide starke Inhibitoren der ODC darstellen: das 1-Oxypurinolribonucleotid, welches aus Oxypurinol und PRPP mittels der HGPRT entsteht, und das 7-Oxypurinolribonucleotid, dessen Aufbau durch die Orotatphosphoribosyltransferase katalysiert wird (2). Diese beiden Oxypurinolribonucleotide dürften wirksamere Inhibitoren der ODC darstellen als die Ribonucleotide von Allopurinol und Xanthin. 7-Oxypurinolribonucleotid ist wahrscheinlich der einzige Metabolit, der die Pyrimidinsynthese bei Allopurinol-behandelten Lesh-Nyhan-Patienten hemmt.

Der Hemmung der ODC folgt unter kontinuierlicher Verabreichung von Allopurinol ein Anstieg der Aktivität der Orotatphosphoribosyltransferase und der ODC, ohne daß eine Änderung der renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin beobachtet wird (4, 21).

Die Ursache dieses Enzymanstiegs ist noch nicht vollständig geklärt. Untersuchungen von Gröbner und Kelley (1975) deuten darauf hin, daß der Anstieg beider Enzymaktivitäten auf eine Enzymstabilisierung auf der Basis einer Änderung der Molekülgröße beruht (67).

Zöllner und Gröbner berichteten 1971 zum ersten Male über eine Beeinflussung der durch Allopurinol induzierten Orotazidurie mittels Ribonucleinsäure (77). Die zusätzliche tägliche Verabreichung von 4 g Ribonucleinsäure (RNS) bewirkte bei gesunden Versuchspersonen, die eine purinarme Diät erhielten und täglich 400 mg Allopurinol einnahmen, innerhalb weniger Tage eine deutliche Abnahme der renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin. Weitere Untersuchungen von Zöllner und Gröbner aus dem Jahre 1975 zeigten, daß neben RNS und RNS-Hydrolysat (4 g/die) auch die in der RNS enthaltenen Nucleotide Uridin-5-monophosphat (1 g/die), Cytidin-5-monophosphat (1 g/die) und Guanosin-5-monophosphat (1 g/die) die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie vermindern, wohingegen 1 g Adenosin-5-monophosphat keinen Effekt ausübte (76).

In einer Untersuchung aus dem Jahre 1978 stellten Zöllner und Gröbner schließlich den Einfluß von Purin- und Pyrimidinnucleosiden auf die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie dar. Dabei führte sowohl die Gabe der Purinnucleoside Guanosin (3 g/die) und Adenosin (3 g/die) wie auch der Pyrimidinnucleoside Cytidin (3 g/die) und Uridin (3 g/die) zu einer Verminderung der durch Allopurinol hervorgerufenen renalen Orotsäureausscheidung (79).

Diese Ergebnisse lassen sich am ehesten mit einer Hemmung der Pyrimidinbiosynthese durch RNS bzw. obige Nucleoside zurückführen. Damit in Einklang steht auch die klinische Beobachtung, daß bei der hereditären Orotazidurie die Zufuhr von Uridin zu einer deutlichen Abnahme der Orotsäureausscheidung im Urin führt (6, 34).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Problemstellung

Seit dem Jahre 1970 weiß man, daß es unter der kontinuierlichen Gabe von Allopurinol zu einer vermehrten renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin kommt. Dieser Effekt ist auf eine Hemmung des Enzyms Orotidyldecarboxylase (ODC) zurückzuführen, das für die Umwandlung von Orotidin-5-monophosphat in Uridin-5-monophosphat verantwortlich ist. Bereits 1971 wurde von Zöllner und Gröbner gezeigt, daß durch zusätzliche Verabreichung von RNS die Orotazidurie weitgehend aufgehoben werden kann. Außerdem weiß man, daß bei Patienten mit hereditärer Orotazidurie die Zufuhr von Uridin zu einer deutlichen Abnahme der Orotsäureausscheidung im Urin führt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, unter definierten Versuchsbedingungen

1. den Einfluß der Purinnucleoside Adenosin und Guanosin, des Purinnucleotides Inosin-5-monophosphat und des Pyrimidinnucleosides Cytidin auf die durch Allopurinol induzierte Orotacidurie zu prüfen,

2. die Aktivitätsänderungen des Enzyms Orotidyldecarboxylase während des Versuchsablaufs zu beschreiben,

3. die Wirkung von Allopurinol auf Serumharnsäure, renale Harnsäure- und Oxypurinausscheidung und deren Beeinflussung durch orale Verabreichung von Guanosin, Adenosin, Inosin-5-monophosphat und Cytidin zu untersuchen.

3.2. Methodik

3.2.1. Versuchspersonen und Versuchsbedingungen

Die Untersuchungen wurden an 4 gesunden männlichen Versuchspersonen im Alter von 21 bis 27 Jahren durchgeführt.

Die Versuchspersonen erhielten 29 Tage lang eine isoenergetische purinfreie Diät. Da wichtig war, daß sie über den gesamten Zeitraum ihr Körpergewicht konstant hielten, berechneten wir für jede Versuchsperson die täglich benötigte Kalorienzufuhr aus der Körperoberfläche, dem Alter und der täglichen Leistungsanforderung (Tab. 1). Diese Menge wurde auf 4 Portionen regelmäßig über den Tag verteilt. Als Getränk durften nur Mineralwasser, Kaffee oder Tee mit Süßstoff zugeführt werden, wobei das tägliche Urinvolumen (mindestens 1,5 Liter) weitgehend konstant bleiben sollte. Körperliche Anstrengungen sowie Störungen des Tag-Nacht-Rhythmus waren während des Versuchsablaufs zu vermeiden. Die Versuchspersonen mußten täglich den 24-Stunden-Urin sammeln, jeden zweiten Tag wurde morgens nüchtern 10 ml Blut entnommen. Um eine Kontrollmöglichkeit über den Versuchsablauf zu bekommen, führten wir ein Versuchsprotokoll, in welchem täglich die Eßmenge, die Trinkmenge, das Allgemeinbefinden, das Körpergewicht und die Menge des 24-Stunden-Urins eingetragen wurden.

Tabelle 1: Versuchspersonen und ihre Daten

Versuchs-personen	Alter	Geschlecht	Größe	Gewicht	Körper-oberfläche	Zulage
Einheit	Jahre		cm	kg	m^2	4 g/die
V_1	24	m	185	76	2,00	Guanosin
V_2	21	m	187	64	1,86	Adenosin
V_3	24	m	194	74	2,04	Inosin-5-monophosphat
V_4	27	m	177	65	1,80	Cytidin

3.2.2. Durchführung des Versuchs (Abb.9)

Die vier Versuchspersonen erhielten über einen Zeitraum von 29 Tagen eine isokalorische, purinfreie Kost. Täglich wurde die renale Ausscheidung der Gesamtorotsäure (Orotsäure + Orotidin), der Harnsäure und der Oxypurine im Urin und jeden zweiten Tag aus dem Plasma die Harnsäure sowie im Erythrozyten die Aktivität der ODC bestimmt. Nach einer Beobachtungsperiode von vier Tagen unter der genannten Formeldiät erhielten alle Versuchspersonen täglich 400 mg Allopurinol auf 4 Portionen pro Tag verteilt. Diese Periode dauerte 10 Tage, wobei in diesem Zeitraum ein Gleichgewicht der oben genannten Parameter eintreten sollte.
In der nächsten Periode, die sich wiederum über 10 Tage erstreckte, legten wir für je 1 Versuchsperson täglich 3 g Guanosin, Adenosin, Inosin-5-monophosphat oder Cytidin auf 4 Portionen verteilt zu.
Schließlich setzten wir in der letzten Periode Allopurinol ab und gaben nur noch täglich 3 g der oben genannten Nucleoside bzw. des Nucleotids zusätzlich zur Formeldiät.

VERSUCHSPERIODE	I	II	III	IV
DIÄT	PURINFREIE KOST			
ALLOPURINOL		ALLOPURINOL 400 mg/die		
NUCLEOSID/NUCLEOTID			NUCLEOSID BZW. NUCLEOTID 3g/die	

VERSUCHSTAGE	1 2 3 4	5 6 7 8 9 10 11 12 13 14	15 16 17 18 19 20 21 22 23 24	25 26 27 28 29
V 1	PURIN- UND PYRIMIDINFREIE KOST	PURIN- UND PYRIMIDIN-FREIE KOST + ALLOPURINOL 400 mg/die	P + A + GUANOSIN 3g/die	P + GUANOSIN
V 2			P + A + ADENOSIN 3g/die	P + ADENOSIN
V 3			P + A + IMP 3g/die	P + IMP
V 4			P + A + CYTIDIN 3g/die	P + CYTIDIN
OROTSÄURE IM URIN	TGL.	TÄGLICH	TÄGLICH	TGL.
HARNSÄURE IM URIN	"	"	"	"
Oxypurine IM URIN	"	"	"	"
HARNSÄURE IM PLASMA	X X	X X X X X	X X X X X X	X X
ODC-AKTIVITÄT IM ERYTHROZYTEN	X X	X X X X X	X X X X X X	X X
TRINKMENGE	TGL.	TÄGLICH	TÄGLICH	TGL.
24-STD URIN-VOLUMEN	"	"	"	"
KÖRPERGEWICHTS-KONTROLLE	"	"	"	"

B.9 VERSUCHSABLAUF (X = Tag, zu dessen Beginn die Blutentnahme stattfand)

P = PURINFREIE KOST A = ALLOPURINOL 400 mg/die

3.2.3. Diät

Die Versuchspersonen wurden während der Versuchsperiode mit einer Formeldiät ernährt, welche sämtliche zum Leben notwendigen Nahrungsbestandteile enthielt, jedoch völlig frei von Purinstoffen war. Sie setzte sich zusammen aus einem Kohlenhydratanteil von 55 Energieprozent, einem Proteinanteil von 15 Energieprozent (in Form von Magermilchsprühpulver), einem Fettanteil von 30 Energieprozent (in Form von Livio-Speiseöl) und den notwendigen Vitaminen und Elektrolyten. Der durch das Magermilchsprühpulver nicht gedeckte Anteil an Kohlenhydraten wurde in Form von Maltodextrin, einem Glucoseoligomer, zugeführt.

Bei der Herstellung des Nahrungsbreies erfolgte zuerst ein genaues Abwiegen der für jede Versuchsperson nötigen Menge an Magermilchsprühpulver und Maltodextrin mit einer Analysenwaage. Die Menge an Livio-Öl wurde in ml gemessen. Anschließend vermengten wir diese Bestandteile zusammen mit 1000 ml Wasser zu einem homogenen Brei und füllten ihn in vorgefertigte Milchtüten. Die pro Tag benötigte Nahrungsmenge wurde dabei auf 4 Portionen aufgeteilt.

Tabelle 2 : Berechnung der Diätzusammensetzung, bezogen auf 1000 kcal

Bestandteile	Protein (P) 1 g ≙ 4,1kcal	Kohlenhydrat (K) 1 g ≙ 4,1kcal	Fett (F) 1 g ≙ 1,1 ml ≙ 9 kcal
Anteile % ≙ kcal	15 % ≙ 150 kcal	55 % ≙ 550 kcal	30 % ≙ 300 kcal
Magermilchsprühpulver (MMSP) 33 % P 47 % K 0,7% F	150kcal≙37,5g enthalten in $37,5 \times \frac{100}{33}$ g = 113,6 g	113,6g MMSP enthalten $113,6 \times \frac{47}{100}$ g = 53,3 g	0,73 % ≙ 0,83 g
Maltodextrin 94 % K		550kcal≙137,5g 137,5g-53,3g = 84,2 g 84,2gKHenthalt. $84,2 \times \frac{100}{94}$ g =89,7g Maltod.	
Livioöl 100 % F			300 kcal ≙ 32,2 g 32,2g-0,83g=31,4g 31,4g≙34,5 ml
Faktor $f = \frac{g}{1000 \text{ kcal}}$	f (P) = 113,6	f (K) = 89,7	f (F) = 34,5

Berechnung der Diätzusammensetzung nach der Formel:

$$\text{Substanz (g/24 h)} = \text{Faktor} \times \frac{\text{Gesamtkalorien/VP und Tag}}{1000}$$

Aus den Werten der Tabelle 3 ergibt sich ein Bedarf von 113,6g MMSP, 89,7g Maltodextrin und 34,5 ml Livio-Öl pro 1000 kcal.

Tabelle 3: Täglicher Kalorienbedarf der einzelnen Versuchspersonen (Die Oberfläche wurde nach Du Bois ermittelt, der Grundumsatz nach den Tabellen von Boothby errechnet)

VP	Oberfläche (m^2)	Grundumsatz (kcal/ m^2/h)	Tagesumsatz (kcal/24 h)	Faktor (leichte körperl. Tätigkeit)	Tagesarbeitsumsatz (kcal/24 h)
V_1	2,00	38,7	1858	1,5	2787
V_2	1,86	39,4	1759	1,5	2638
V_3	2,04	38,7	1876	1,5	2814
V_4	1,80	38,0	1641	1,5	2462

3.2.4. Methoden

3.2.4.1. Harnsäurebestimmung

Enzymatische Methode nach Praetorius und Poulsen (1953) Modifikation durch Zöllner (1963).

Prinzip:

Durch die Einwirkung von Uricase wird Harnsäure in Allantoin umgewandelt. Gleichzeitig verschwindet die typische Absorptionsbande bei 293 nm. Dieser Extinktionsabfall beträgt bei Verwendung des angegebenen Glycinpuffers 0,0745 für eine Harnsäurekonzentration von 1 µg/ml und eine Schichtdicke von 1 cm.

Lösungen:

1. Glycinpuffer-Stammlösung 2/3 molar, ph = 9,3

2. Glycinpuffer-Gebrauchslösung
   Die Stammlösung wird mit bidestilliertem Wasser 1 : 10 verdünnt.

3. Enzympräparat Uricase Löwens (Lovens Kemiske, Kopenhagen) 75 Units/Ampulle

4. Uricase Stammlösung
   Der Inhalt einer Uricaseampulle wird in 0,25 ml der Puffer-Gebrauchslösung aufgelöst.

5. Uricase-Gebrauchslösung
   Verdünnung der Uricase-Stammlösung mit Puffer-Gebrauchslösung 1 : 100
   Die Eigenextinktion dieser Lösung liegt zwischen 0,010 und 0,015

Durchführung:

1 ml Serum bzw. 0,2 ml Harn wird mit Puffer-Gebrauchslösung im Meßkölbchen auf 25 ml verdünnt. Dabei ist darauf zu achten, daß Serum im alkalischen Milieu leicht schäumt und deshalb sehr vorsichtig gemischt werden sollte. Da Harnsäure im alkalischen Milieu an der Luft oxydiert, muß von diesem Schritt an zügig weiter gearbeitet werden.

Für die Photometrie werden folgende Ansätze gemacht:

I. Zur Bestimmung der Eigenextinktion des Enzyms (E_F)

1. 2 ml Puffer-Gebrauchslösung;
   1 ml Uricase-Gebrauchslösung;

2. 3 ml Puffer-Gebrauchslösung;

II. Zur Bestimmung des Extinktionsabfalls im Serum- bzw. Urinansatz (E_{HS}).

3. 2 ml verdünntes Serum bzw. Urin;
   1 ml Puffer-Gebrauchslösung;

4. 2 ml verdünntes Serum bzw. Urin;
   1 ml Uricase-Gebrauchslösung.

Alle Ansätze sind gut durchzuschütteln und bei Zimmertemperatur 20 Minuten stehenzulassen.
Die Photometrie erfolgt am Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 293 nm mit Quarzküvetten von 10 mm Schichtdicke. Zur Bestimmung der Eigenextinktion des Fermentes wird I, 1 gegen I, 2 als Nullwert abgelesen. Bei den Serum- bzw. Urinansätzen dient II, 4 als Nullwert für die Ablesung II, 3.

Berechnung:

Bei der photometrischen Ablesung der Serum- bzw. Urinverdünnung vor Uricaseeinwirkung gegen die Serum- bzw. Urinverdünnung nach Uricaseeinwirkung (E_{HS}) wird nicht berücksichtigt, daß nur einem der Ansätze Uricase zugesetzt wird. Der Extinktionsdifferenz dieser Ablesung ist deshalb die Eigenextinktion des Enzyms (E_F) zuzuzählen. Die Harnsäurekonzentration ist proportional ($E_F + E_{HS}$).

Der Extinktionskoeffizient für eine Harnsäurelösung von 1 ug/ml in einer 1cm-Küvette beträgt 0,0745. Für die Berechnung der Harnsäurekonzentration im Versuchsansatz ergibt sich deshalb folgende Formel:

$$\frac{E_F + E_{HS}}{0{,}0745} = \mu g/ml$$

Unter Berücksichtigung der einzelnen Verdünnungen berechnet sich daraus die Harnsäurekonzentration (HS) der verwendeten Proben:

Serum:

$$HS_{Serum} = \frac{(E_F + E_{HS}) \times 3 \times 25 \times 100}{0{,}0745 \times 2 \times 100}$$

$$= (E_F + E_{HS}) \times 50 \qquad \text{mg \% Harnsäure}$$

Urin:

$$HS_{Urin} = \frac{(E_F + E_{HS}) \times 3 \times 125 \times 100}{0{,}0745 \times 2 \times 1000}$$

$$= (E_F + E_{HS}) \times 250 \qquad \text{mg \% Harnsäure}$$

Daraus berechnet sich wiederum die im 24-h-Urin ausgeschiedene Harnsäuremenge:

$$HS/24\ h = (E_F + E_{HS}) \times 250 \times \frac{\text{Harnvolumen}/24\ h}{100}\ mg/24\ h$$

3.2.4.2. Methode zur enzymatischen Bestimmung der Oxypurine (Xanthin und Hypoxanthin) nach Klinenberg et al. (1967).

Unter Einwirkung des Enzyms Xanthinoxydase (XO) werden Xanthin (X) und Hypoxanthin (HX) in alkalischer Lösung zu Harnsäure (HS) oxidiert, was zu einem Absorptionsanstieg bei 293 nm führt. Durch die Einwirkung von Uricase kann die entstandene Harnsäure wiederum in Allantoin umgewandelt werden, wodurch die typische Absorptionsbande bei 293 nm verschwindet. Wird die im Urin ausgeschiedene Harnsäure in einem Ansatz mit Uricase zu Allantoin abgebaut und in einem zweiten Ansatz die vorgebildete (präformierte) Harnsäure und die nach Xanthinoxydase-Zugabe aus den Oxypurinen neugebildete Harnsäure insgesamt abgebaut, so kann man die aus den Oxypurinen gebildete Harnsäure rechnerisch ermitteln.

Ansatz I: präformierte HS

Ansatz II: präformierte und neugebildete HS

Die aus den Oxypurinen neugebildete Harnsäure erhält man aus der Differenz zwischen den HS-Mengen aus Ansatz II und Ansatz I.

Oxypurin - HS = Gesamt - HS - präformierte HS

Lösungen:

1. Xanthinoxidase (Boehringer Mannheim GmbH)
   - Suspension aus Kuhmilch:

   10 ml = 100 mg Enzymprotein, 4 U/ml

2. Xanthinoxidase - Gebrauchslösung

   2 ml XO verdünnt mit 0,66 ml Na-Pyrophosphatpuffer 0,1 m, ph 8,6 und 0,1 ml Katalase
   (zur Verhinderung des oxidativen Abbaus der Harnsäure im Reaktionsgemisch)

3. Katalase (Boehringer Mannheim GmbH)
   - Rinderleber, Lösung in Glycerin

4. Uricase (Lovens Kemiske Fabrik, DK)
   75 U/Ampulle

5. Uricase Gebrauchslösung
   Verdünnung wie bei der Harnsäurebestimmung

6. Natrium - Pyrophosphatpuffer 0,1 m; ph 8,6

7. Glycinpuffer 0,1 m; ph 9,3

Durchführung:

Die Urinproben werden mit aqua bidestillata 1:50 verdünnt. In 2 Reagenzgläser, entsprechend dem Ansatz I und II, werden jeweils 1 ml der Urinverdünnung und 2 ml NaPP-Puffer gegeben.

Bei einer Wellenlänge von 293 nm erfolgt nun die Bestimmung der Extinktion des Urin-Puffergemisches in Ansatz I und II. Der Küvetteninhalt wird anschließend quantitativ in die Reagenzgläser zurückgegeben. Zu Ansatz II mischt man schließlich 0,01 ml XO bei und liest nach einer Inkubationszeit von ca. 30 Minuten erneut die Extinktion ab. Zuletzt wird zu Ansatz I und II jeweils 0,5 ml Uricasegebrauchslösung gegeben und nach 3 - 4 Stunden ebenfalls die Extinktion am Photometer bestimmt. Zur größeren Genauigkeit empfiehlt es sich, von Ansatz I und II jeweils Doppelwerte anzufertigen.

Nach Zugabe von XO steigt die Extinktion vom Ausgangswert kontinuierlich bis zu einem Maximalwert an. Nach Zugabe von Uricase sinkt die Extinktion in beiden Ansätzen nach Beendigung der Reaktion unter den Ausgangswert ab, sofern der Urin nicht hoch konzentriert ist. Die Endextinktion von Ansatz II ist höher als die von Ansatz I, da XO eine Eigenextinktion hat, die durch Differenzbildung in der Berechnung nicht berücksichtigt zu werden braucht. Dasselbe gilt für die Eigenextinktion der Uricase.

Übersicht über die Ansätze:

Ansatz I: Präformierte Harnsäure

1. Messung:	1 ml Urinverdünnung 2 ml NaPP-Puffer	E_1
2. Messung:	1 ml Urinverdünnung 2 ml NaPP-Puffer 0,5 ml Uricase	E_2

Ansatz II: Gesamt-Harnsäure

1. Messung:	1 ml Urinverdünnung 2 ml NaPP-Puffer 0,01 ml XO	E_3
2. Messung:	1 ml Urinverdünnung 2 ml NaPP-Puffer 0,01 ml XO 0,5 ml Uricase	E_4

Berechnung: (E)

Gesamt-Harnsäure: $E_G = E_3 - E_4$

Präformierte Harnsäure: $E_P = E_1 - E_2$

Die Berechnung der neugebildeten Harnsäure erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{neug. HS} = \frac{(E_G - E_P) \times 50 \times 3 \times \text{Urinmenge}/100}{0{,}075 \times 1000} \text{ mg/24 h}$$

bzw.:

$$\text{neug.HS} = (E_G - E_P) \times 2 \times \frac{\text{Urinmenge}}{100} \text{ mg/24 h}$$

3.2.4.3. Orotsäurebestimmung im Urin

Methode nach Rogers und Porter (1968)

Prinzip:

Orotsäure reagiert mit gesättigtem Bromwasser zu 5, 5' - Dibrombarbitursäure, welche wiederum durch Ascorbinsäure zur Barbitursäure reduziert wird. Barbitursäure und p-Dimethylaminobenzaldehyd (Ehrlich-Reagenz) ergeben einen gelben Farbkomplex, dessen Absorptionsmaximum bei 480 nm liegt.

Reagenzien:

1. Kalium-Citratpuffer, 0,2 m, ph 2,5
2. gesättigtes Bromwasser
3. Ascorbinsäure 5 %, gelöst in Kalium-Citrat
4. p-Dimethylaminobenzaldehyd 2,5 %
   (Ehrlich-Reagenz), gelöst in n-Propanol

Berechnung:

Die Extinktion am Photometer wird sowohl bei 480 nm wie auch bei 412 nm abgelesen. Dabei ist die Extinktion bei 480 nm proportional der im Urinansatz enthaltenen Menge an Orotsäure. Neben Orotsäure zusätzlich im Urin enthaltene Substanzen bewirken bei 480 nm ebenfalls eine gewisse Extinktion, deren Absorptionsmaximum bei 412 nm liegt. Erfahrungsgemäß verhalten sich die Extinktionswerte dieser Substanzen bei 412 nm und bei 480 nm wie 3 : 1 (65). Daraus ergibt sich, daß der bei 480 nm abgelesene Wert für die Orotsäureextinktion um ein Drittel des bei 412 nm abgelesenen Extinktionswertes berichtigt werden muß.

$$E_{Orotsäure} = E_{480} - \frac{E_{412}}{3}$$

Zur Umsetzung der Extinktionswerte in Orotsäuremengen muß anhand einer Verdünnungsreihe aus Orotsäurestammlösung (8 mg/100 ml) eine Eichkurve erstellt werden.

Für die tägliche, mit dem Urin ausgeschiedene Orotsäuremenge ergibt sich bei dem verwendeten Ansatz folgende Berechnungsformel:

$$\text{Orotsäure/24 h} = \left(E_{480} - \frac{E_{412}}{3}\right) \times 2 \times HV \text{ mg/die}$$

HV = Harnvolumen in ml/24 h

Durchführung:

Vor der Verwendung der Urinproben müssen diese erwärmt und nicht in Lösung gehendes Sediment abfiltriert werden. Die Orotsäurebestimmung wird bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Für die Photometrie wird folgender Ansatz gemacht:

0,5 ml Urin
2,5 ml Kalium-Citratpuffer
0,5 ml Bromwasser

Nach 1 Minute
1 ml Ascorbinsäure (schütteln)

nach 2 Minuten
2 ml Ehrlich-Reagenz (schütteln)

Die Reaktion dauert 90 Minuten. Anschließend kann die Extinktion am Photometer bei 480 nm und bei 412 nm gegen einen Leerwert abgelesen werden. Der Leerwert enthält sämtliche in obigem Ansatz beschriebenen Reagenzien außer 0,5 ml Urin.

3.2.4.4. Messung der Enzymaktivität der Orotidyl-Decarboxylase (ODC) nach Appel (1968) sowie Kelley und Beardmore (1970)

Prinzip:

Zu einem Hämolysat, in welchem Orotidyl-Decarboxylase (ODC) vorhanden ist, wird Orotidin-5-monophosphat-7-^{14}C zugegeben. Die ODC spaltet von dieser Verbindung die radioaktiv markierte Carboxylgruppe ($^{14}CO_2$) in Position 7 ab. Das $^{14}CO_2$ reagiert mit Hyaminhydroxid unter Bildung von Karbonat und H_2O. Nach Erfassung der Radioaktivität mit Hilfe eines Szintillationszählers kann unter Berücksichtigung der Eiweißmenge im Hämolysat auf die Orotidyl-Decarboxylaseaktivität rückgeschlossen werden, da die $^{14}CO_2$-Freisetzung sich proportional zu Reaktionsdauer und Eiweißmenge verhält.

Reagenzien:

1. OMP-7^{14}C 10 µM (Orotidin-Carboxyl-^{14}C-5-monophosphat als Triammoniumsalz, spezifische Aktivität 34,9 µCi/uMol, (New England Nuclear, Boston, USA)

2. 0,01 Kalium-Phosphatpuffer, ph = 7,4

3. Hyaminhydroxid

4. Perchlorsäure 4 m

Durchführung:

Das dialysierte Hämolysat wird mit Kalium-Phosphatpuffer 0,01 m, ph 7,4 1:10 verdünnt, die Substratlösung OMP-7^{14}C mit dem gleichen Puffer 1:20 verdünnt.

Von dem verdünnten Hämolysat werden 50 µl in ein Reagenzglas gegeben und in einem Eiswasserbad kühl gestellt, um mögliche Stoffwechselvorgänge auf ein Minimum zu reduzieren. Nach Zugabe von 50 µl des verdünnten OMP-7^{14}C wird das Reagenzglas umgehend mit einem Gummistopfen verschlossen, der das mit Hyaminhydroxid gefüllte Auffangkölbchen trägt und die Reaktion gestartet, indem man das Reagenzglas vom Eiswasserbad in ein auf 37 ^{o} C temperiertes Wasserbad taucht. Nach 15 Minuten wird die Reaktion mit 0,2 ml Perchlorsäure gestoppt. Hierbei ist zu beachten, daß die Injektion der Perchlorsäure in den Reaktionsraum zügig erfolgt und ein Kontakt mit dem Auffangkölbchen vermieden wird.
Zur Äquilibrierung werden die Proben nach Reaktionsende für rund 60 Minuten im Inkubator belassen. Daraufhin wird der Gummistopfen vom Auffanggefäß abgeschnitten und dieses in ein mit Szintillationsflüssigkeit gefülltes Zählgefäß eingegeben. Die Proben werden in einem Szintillationszähler ausgezählt, dessen Effizienz 90 % beträgt.

Berechnung:

Spezifische Aktivität des OMP-7^{14}C:

1 µMol = 34,9 µCi (wird bei Lieferung angegeben)

1 µCi = $2{,}22 \times 10^6$ cpm

d.h. bei einer Zählausbeute von 90 %:

1 µMol = $34{,}9 \times 2{,}22 \times 10^6 \times 0{,}9$ cpm

1 µMol = $69{,}7 \times 10^6$ cpm

1 nMol = $69{,}7 \times 10^3$ cpm

Aus der Anzahl der cpm im Ansatz (A) errechnet sich die Menge von OMP-7^{14}C, die bei der Reaktion umgesetzt wurde (X [nMol])

$$X \text{ nMol} \mathrel{\hat{=}} A \text{ cpm}$$

$$\frac{1 \text{ nMol}}{X \text{ nMol}} \mathrel{\hat{=}} \frac{69{,}7 \times 10^3 \text{ cpm}}{A \text{ cpm}}$$

$$X \text{ nMol} \mathrel{\hat{=}} \frac{A \text{ cpm} \cdot \text{nMol}}{69{,}7 \times 10^3 \text{ cpm}}$$

Die Reaktionszeit betrug 15 Minuten, sodaß bei Umrechnung auf 1 Stunde der Faktor 4 eingefügt werden muß.

$$X \text{ nMol/h} = \frac{A \times 4}{69{,}7 \times 10^3} \text{ nMol/h}$$

Da die pro Zeiteinheit umgesetzte Substratmenge X von der im Hämolysat enthaltenen Eiweißmenge abhängig ist, muß diese bestimmt und bei der Berechnung der Aktivität der ODC berücksichtigt werden.

Die Eiweißbestimmung im Erythrozytenhämolysat erfolgt nach der Methode von Lowry et al. (1951)

Prinzip:

Das Eiweiß wird durch zwei verschiedene Reaktionen in einen spektrophotometrisch meßbaren Farbkomplex umgewandelt.

1. Eiweiß reagiert mit Kupfer in alkalischem Milieu, indem sich Cu^{++}-Ionen an die Peptidbindungsstellen anlagern (Biuretreaktion).

2. Das mit Kupfer vorbehandelte Protein reduziert das Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz.

Reagenzien:

1. 2 % Na_2CO_3 -Lösung in 0,1 n NaOH

2. 0,5 % Kupfer-Sulfat -Lösung ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) in 1 % Na-K-Tartrat.

3. Alkalische Kupferlösung aus 50 ml Reagenz 1 und 1 ml Reagenz 2

4. Folin-Ciocalteus-Phenol-Lösung, 1:2 mit H_2O verdünnt.

5. 0,01 m Kalium-Phosphatpuffer, ph 7,4

Durchführung:

Das dialysierte Hämolysat wird mit Kaliumphosphatpuffer 0,01 m, ph 7,4 1 : 20 verdünnt und anschließend mit 0,9% NaCl-Lösung auf 1:400 weiterverdünnt.

200 µl des auf 1:400 verdünnten Hämolysats werden mit 2 ml alkalischer Kupferlösung (Reagenz 3) gemischt, gut geschüttelt und 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt schnelle Zugabe von Folin-Ciocalteus-Phenol-Lösung (Reagenz 4) und sofortiges Schütteln. Nach 30 Minuten Inkubation bei Zimmertemperatur erfolgt daraufhin die spektrophotometrische Extinktionsmessung bei 498 nm. Als Leerwert dient eine Mischung aus 200 ul NaCl und sämtlichen oben genannten Reagenzien.

Berechnung:

Die Extinktionswerte werden mittels einer Eichkurve in die im jeweiligen Ansatz enthaltene Eiweißmenge umgerechnet. Die Eichkurve wird mit Hilfe einer Rinder-Albumin-Standardlösung aufgestellt.

Eichkurve-Standard: 100 mg Rinderalbumin in 100 ml 0,9 % NaOH;

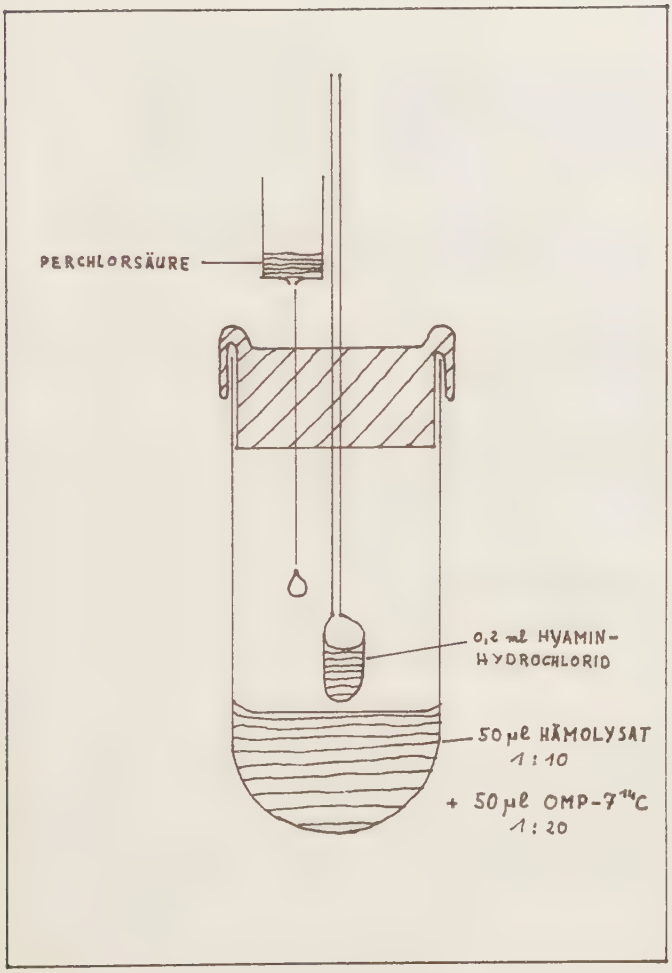


Abb. 10

Bestimmung der Orotidyldecarboxylaseaktivität

Berechnung der ODC-Aktivität:

Bei der Bestimmung der ODC-Aktivität wurden 0,05 ml des 1:10 verdünnten Hämolysats verwendet, bei der Bestimmung der Eiweißmenge (E) dagegen 0,2 ml des 1:400 verdünnten Hämolysats. Dies bedeutet, daß bei der Eiweißbestimmung die Verdünnung des Hämolysats zehn mal stärker war als bei der ODC-Bestimmung, was für die Berechnung der ODC-Aktivität berücksichtigt werden muß.

Die pro mg Eiweiß und Stunde umgesetzte Substratmenge entspricht der Enzymaktivität der Orotidyldecarboxylase:

$$X \text{ nMol/mg/h} = \frac{A \times 4}{69{,}7 \times 10 \times E} \text{ nMol/mg/h}$$

E = Eiweißmenge in mg

A = Anzahl der counts/min. im Ansatz

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Der Einfluß von Allopurinol auf die Orotsäureausscheidung (Orotidin + Orotsäure) des Menschen sowie deren Beeinflussung durch ein oral verabreichtes Nucleosid bzw. Nucleotid (Guanosin, Adenosin, Inosin-5-monophosphat und Cytidin).

Einen typischen Kurvenverlauf zeigt Abb. 11. Unter Formeldiät allein liegt die Orotsäureausscheidung im Urin bei 2 mg/die. Nach Zugabe von 400 mg Allopurinol/die steigt die Orotsäureausscheidung schnell an und liegt zwischen dem 8. und 14. Tag bei 17 bis 24 mg/Tag. Ein steady state wird nicht sicher erreicht. Ab dem 15. Tag erhält die Versuchsperson zusätzlich zum Allopurinol noch 3 g des Purinnucleotides Inosin-5-monophosphat täglich. Daraufhin sinkt die Orotsäureausscheidung langsam ab und erreicht gegen Ende dieser Periode Werte von 10 mg/Tag.

Im letzten Abschnitt schließlich wird Allopurinol abgesetzt und nur noch Inosin-5-monophosphat gegeben, worauf die Orotsäureausscheidung bis auf den Ausgangswert von 2 mg/die zurückgeht.

Einen im Prinzip gleichen Kurvenverlauf zeigen die Abb. 12 bis 14, in welchen die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie durch Zugabe des Purinnucleosids Guanosin (Abb. 13) bzw. Adenosin (Abb. 12) und des Pyrimidinnucleosids Cytidin (Abb. 14) gesenkt wird.

Bei Versuchsperson 4 (Abb. 14) entspricht zwar der Kurvenverlauf im Prinzip den anderen Kurven, jedoch bestehen quantitative Unterschiede. Die Orotsäureausscheidung steigt hier nach Allopurinolgabe von 2 mg/die auf 46 mg/die an und sinkt unter Zugabe des Pyrimidinnucleosids Cytidin auf ungefähr 21 mg/die ab.

Bei allen Versuchspersonen erreicht die Orotsäureausscheidung nach Absetzen von Allopurinol in Versuchsperiode 4 innerhalb von 5 Tagen wieder Normalwerte.

Tabelle 4:

Renale Orotsäureausscheidung unter purinfreier Formeldiät während der Gabe von 400 mg Allopurinol (Säule a) sowie nach Zulage von Guanosin, Adenosin, Inosin-5-monophosphat und Cytidin (Säule b). Um die Hemmung auszudrücken, wurde die Differenz zum Basalwert (= 100 %) in Beziehung gesetzt. Es ist dabei zu berücksichtigen, daß ein steady state nicht erreicht wurde.

Nucleosid/ Nucleotid	Dosis	Renale Orotsäureausscheidung			
	g/die	a) Basal-experiment (mg/24 h)	b) Nucleosid-zulage (mg/24 h)	Differenz	Hemmung %
Guanosin	3	25,8	16,6	9,2	36
Adenosin	3	18,3	12,8	5,5	30
Inosin-5-monophosphat	3	20,1	11,4	8,7	43
Cytidin	3	54	23,7	30,3	56

3.3.2. Aktivitätsänderungen des Enzyms Orotidyldecarboxylase (ODC) während des Versuchsablaufs

Die Abb. 15 - 18 zeigen das Verhalten der ODC bei den einzelnen Versuchspersonen. Unter Allopurinolzufuhr kommt es in allen Fällen innerhalb von 2 Wochen zu einem Anstieg der Enzymaktivitäten um durchschnittlich 100 %.
Nach Zugabe eines Nucleosids bzw. Nucleotids zeigen die einzelnen Versuchspersonen dagegen ein unterschiedliches Verhalten. So beobachtet man unter Guanosin (Abb. 18) einen weiteren, jedoch geringeren Anstieg der Enzymaktivität bis zum Ende der Periode 3. Unter Cytidin, Adenosin und Inosin-5-monophosphat bleibt die Aktivität zuerst für 3 Tage konstant, fällt dann innerhalb von 2 Tagen sehr stark ab, steigt gleich darauf steil an und erreicht am Ende der Periode wieder einen Höhepunkt.

Nach Absetzen von Allopurinol fallen in der letzten Periode schließlich bei allen Personen die Enzymaktivitäten wieder ab. Ein steady state wurde auch hier nicht sicher erreicht.

3.3.3. Der Einfluß von Allopurinol auf Serumharnsäure, renale Harnsäure- und Oxypurinausscheidung des Menschen sowie deren Beeinflussung durch orale Verabreichung von Guanosin, Adenosin, Inosin-5-monophosphat und Cytidin.

Abb. 19 zeigt einen Versuchsablauf. Die tägliche orale Einnahme von 400 mg Allopurinol unter purinfreier Diät führt bei dieser Versuchsperson innerhalb von 7 Tagen zu einem Abfall der Serumharnsäurekonzentration von 4,55 mg% auf 2,25 mg% und der Harnsäureausscheidung im Urin von 320 mg/24 h auf 203 mg/24 h, während der Oxypuringehalt des Urins von 20 mg/24 h auf 79 mg/24 h ansteigt. Wird neben Allopurinol 3 g Inosin-5-monophosphat pro Tag zugegeben, so steigen im Verlauf von 5 Tagen Serumharnsäure und renale Harnsäureausscheidung an, bleiben jedoch unterhalb der Werte in der Kontrollperiode (Periode 1). Die renale Oxypurinausscheidung erhöht sich gleichzeitig von 79 mg/24 h auf 439 mg/24 h und erreicht damit ihren höchsten Wert. In Periode 1 wurde allerdings im Gegensatz zu Periode 2 und 3 kein steady state erreicht.

Nach Einstellung der Allopurinolgabe unter Fortsetzung der täglichen Inosin-5-monophosphat-Zufuhr kommt es schließlich zu einem weiteren Ansteigen von Serumharnsäure und renaler Harnsäureausscheidung, während die Oxypurine wieder auf ihren Ausgangswert in Periode 1 zurückkehren.
Die Versuchspersonen 1 - 3 (Abb. 19, 20, 21) zeigen unter purinfreier Diät und Allopurinolzugabe grundsätzlich ein gleiches Verhalten. Innerhalb von 7 Tagen sinken die Serumharnsäure von im Mittel 4,4 mg% auf 2,32 mg%, und die renale Harnsäureausscheidung von 313 mg/24 h auf 195 mg/24 h ab. Die Oxypurinausscheidung steigt dabei von durchschnittlich 13 mg/24 h auf 70 mg/24 h an. Dieser Anstieg der renalen Oxypurinausscheidung ersetzt jedoch nicht die Verminderung der renalen Harnsäureausscheidung, so daß die Gesamtpurinausscheidung (Hypoxanthin + Xanthin + Harnsäure) gegenüber der Vorperiode deutlich reduziert ist.

Die Zulage von täglich 3 g des Purinnucleosides Guanosin (V 1) bzw. Adenosin (V 2) oder des Purinnucleotides Inosin-5-monophosphat (V 3) führt zu einer Steigerung der Harnsäurespiegel in Serum und Urin, wobei diese Werte unter Guanosin höher als in der Kontrollperiode (Periode 1) liegen, unter Adenosin und Inosin-5-monophosphat jedoch knapp darunter. Der Anstieg der Harnsäurewerte unter Guanosin um 166 % ist hier wesentlich stärker als unter den Purinen Adenosin und Inosin-5-monophosphat mit ca. 50 % (siehe Tabelle 7). Die Oxypurinausscheidung in dieser Periode steigt ebenfalls sehr stark an, im Mittel von 70 mg/24 h auf 536 mg/24 h. Vergleicht man dabei das Verhältnis Harnsäure- zu Oxypurinausscheidung, so ergibt sich für Guanosin ein Verhältnis 1:1, für Adenosin 1:2 und für Inosin-5-monophosphat 1:1,5 (siehe Abb. 23).

Wird schließlich unter weiterer Purinbelastung Allopurinol abgesetzt, so steigen Serumharnsäure und renale Harnsäureausscheidung erwartungsgemäß weiter an. Die Oxypurinausscheidung sinkt dabei unter Guanosin und Inosin-5-monophosphat bis zu ihrem Ausgangswert in Periode 1 ab, nur unter Adenosin bleibt mit 80 mg/24 h ein relativ hoher Wert bestehen.

Da die Oxypurinausscheidung in dieser letzten Periode sehr stark abfällt, während die Harnsäureausscheidung nur langsam ansteigt, sinkt auch die Gesamtpurinausscheidung gegenüber der Vorperiode deutlich ab. Ein steady state der Harnsäurewerte im Serum und Urin wurde jedoch auch in der Periode 4 nicht erreicht.

Einen wesentlichen Unterschied zu diesen Ergebnissen findet man bei Versuchsperson 4 (Abb. 22). Hier entspricht zwar der Kurvenverlauf in Periode 1 und 2 demjenigen der anderen Versuchspersonen, die Zugabe des Pyrimidinnucleosides Cytidin führt jedoch zu keiner Veränderung der Harnsäureausscheidung oder der Serumharnsäurekonzentration. Sämtliche Werte bleiben relativ konstant bis zum Ende der 3. Periode. Erst nach Absetzen von Allopurinol steigen innerhalb von 4 Tagen Serumharnsäure und Urinharnsäure wieder an, die Werte liegen jedoch nicht höher als in Periode 1, wo die Versuchsperson nur purinfreie Diät, ohne alle Zusätze, erhielt.

4. Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung sollte der Einfluß von exogen zugeführten Purinen und Pyrimidinen auf Biosynthese und Abbau dieser Substanzen geprüft werden. Man erhoffte sich dadurch einen Einblick in die Regulationsmechanismen des Pyrimidin- und Purinstoffwechsels und in mögliche Zusammenhänge beider Stoffwechselwege.

Grundlage des Versuchs war eine purinfreie isoenergetische Formeldiät, welche aus 55 Energieprozent Kohlenhydrate, 30 Energieprozent Fett und 15 Energieprozent Eiweiß bestand. Auf diese Weise konnte man eine Beeinflussung des Stoffwechsels durch Purine der normalen Nahrung oder durch Mangelernährung ausschließen. Die geringe Menge von Pyrimidinen, die mit dem Magermilchsprühpulver zugeführt wurde, war ebenfalls konstant und führte höchstwahrscheinlich nicht zu einer signifikanten Beeinflussung der untersuchten Stoffwechselwege.

4.1. Der Einfluß der oral verabreichten Purine Guanosin, Adenosin und Inosin-5-monophosphat und des Pyrimidinnucleosids Cytidin auf die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie.

Bei allen Versuchspersonen kommt es nach Allopurinolgabe zu einem starken Ansteigen der Orotsäureausscheidung im Urin. Aufgrund von früheren Untersuchungen (18, 38) beruht dieser Effekt auf einer Hemmung des Enzyms Orotidyldecarboxylase, welches für die Umwandlung von Orotidinmonophosphat in Uridinmonophosphat verantwortlich ist. In vitro -Untersuchungen ergaben, daß vor allem die Ribonucleotide von Allopurinol, Oxypurin und Xanthin ausgeprägte Inhibitoren dieses Enzyms darstellen (39). Diese pharmakologisch erzeugte renale Orotsäureausscheidung stellt dabei einen guten Parameter zur Beurteilung der Pyrimidinbiosynthese dar. Bereits 1971 wiesen Zöllner und Gröbner nach (77), daß die orale Verabreichung von Ribonucleinsäure (4 g/die) eine durch Allopurinol induzierte Orotazidurie beträchtlich herabsetzt. In ähnlichen Untersuchungen wurde später gezeigt, daß neben RNS (4 g/die) auch RNS-Hydrolysat (4g/die) sowie die in der RNS enthaltenen Nucleotide Guanosin-5-monophosphat (GMP) (1 g/die), Cytidin-5-monophosphat (CMP) (1 g/die) und Uridin-5-monophosphat (UMP) (1 g/die) eine Senkung der Orotsäureausscheidung im Urin bewirken (78). Dabei war diese Senkung bei Verabreichung von 4 g/die RNS identisch einer Senkung durch 4 g/die RNS-Hydrolysat, welches alle in der RNS vorhandenen Mononucleotide enthielt (68 % für RNS, 69 % für RNS-Hydrolysat). Der Einfluß der einzelnen Bestandteile der RNS in der entsprechenden Dosis (1 g/die) auf die renale Orotsäureausscheidung war jedoch im Vergleich zu 4 g/die RNS geringer, sodaß angenommen werden mußte, daß die Hemmung der Orotazidurie nicht auf ein einzelnes Nucleotid zurückgeführt werden kann (Tab. 12).
1 g/die Adenosin-5-monophosphat übte bei dieser Untersuchung nur einen minimalen Effekt aus.

In weiteren Versuchen wurden deshalb größere Mengen der Mononucleotide verabreicht, wobei sich zeigte, daß 3 g/die UMP in ihrer Wirkung etwa 4 g/die RNS äquivalent sind, während 3 g/die AMP und 3 g/die CMP eine geringere Wirkung zeigten (Tab. 12) (27).

Im vorliegenden Versuch gaben wir nun je einer Versuchsperson täglich 3 g Adenosin, Guanosin, Cytidin oder Inosin-5-monophosphat. In allen 4 Fällen kommt es dabei zu einer starken Senkung der medikamentös induzierten Orotazidurie.

Nach Zugabe von 3 g/die des Nucleosides Adenosin ergab sich eine Verringerung der Orotsäureausscheidung im Urin um 30 %, wobei dieser Wert etwas niedriger liegt als die in früheren Versuchen gefundene Wirkung von 3 g/die des Nucleotides AMP mit 48 % (7).

Unter Guanosin (3 g/die) ging die renale Orotsäureausscheidung um 36 % zurück, wobei bereits in früheren Versuchen nach Zugabe von nur 1 g/die des entsprechenden Nucleotids eine Senkung der Orotazidurie um 50 % beobachtet wurde (27).

Die Wirkung von Inosin-5-monophosphat (3 g/die) konnte bereits in einer anderen Arbeit (7) nachgewiesen werden, und ergab dort eine Reduktion der renalen Orotsäureausscheidung von 34 %. Im Vergleich dazu liegen unsere Ergebnisse mit 43 % Hemmwirkung etwas höher.

Die stärkste Reduktion der durch Allopurinol induzierten Orotazidurie mit 56 % erreichten wir schließlich nach Zugabe von 3 g/die Cytidin. Dieser Wert liegt etwas höher als der in früheren Untersuchungen für das entsprechende Nucleotid Cytidin-5-monophosphat gefundene Wert mit 45 % (7). Der Pyrimidinabkömmling hat hier also eine stärkere Wirkung als die Purinabkömmlinge.

Diese Ergebnisse lassen sich am ehesten damit erklären, daß nach oraler Verabreichung der oben genannten Purine und Pyrimidine eine Hemmung der Pyrimidinbiosynthese zu beobachten ist. An welchen Punkten dabei in die Pyrimidinbiosynthese eingegriffen wird, steht noch nicht fest. Man weiß jedoch, daß das Enzym Carbamylphosphatsynthetase II eine wichtige Funktion in der Regulation der Pyrimidinbiosynthese einnimmt. So wurde bereits nachgewiesen, daß dieses Enzym durch die Pyrimidinnucleotide Uridintriphosphat und Cytidintriphosphat gehemmt und durch 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat aktiviert wird (48). Außerdem wird angenommen, daß auch das Enzym Dihydroorotase, welches die Umwandlung von Carbamylaspartat in Dihydroorotat katalysiert, durch verschiedene Purine und Pyrimidine gehemmt werden kann (8).

Tabelle 5 :

Renale Orotsäureausscheidung unter purinfreier Formeldiät während der Gabe von 400 mg Allopurinol (Säule a) sowie nach Zulage von RNS, RNS-Hydrolysat oder verschiedener Purine und Pyrimidine (Säule b). Vergleich der hier vorgelegten mit den früher an der Medizinischen Polyklinik durchgeführten Untersuchungen.

Nucleosid/ Nucleotid	Dosis g/die	Renale Orotsäureausscheidung a) Basal-experiment	b) Nucleosid- bzw. Nucleotid-zulage	Differenz	Hemmung %
RNS	4	19	6	13	68
RNS-Hydrolysat	4	18,8	5,5	13,3	69
AMP	1	10,9	10,2	-	-
AMP	3	16,9	8,8	8,1	47
Adenosin +	3	18,3	12,8	5,5	30
GMP	1	15,2	7,5	7,7	50
Guanosin +	3	25,8	16,6	9,2	36
IMP +	3	20,1	11.4	8,7	43
CMP	1	18,9	12,2	6,7	35
CMP	3	21,6	11,9	9,7	45
Cytidin +	3	54	23,7	30,3	56
UMP	1	15,8	11,3	4,5	28
UMP	3	16,1	5,7	10,4	65

\+ Diese Stoffe wurden bei der vorliegenden Arbeit untersucht.

4.2. Einfluß von Allopurinol auf die Aktivität der Orotidyldecarboxylase.

Der Anstieg der Aktivität der ODC unter Allopurinol stimmt gut mit Ergebnissen früherer Untersuchungen überein. Bereits Fox und Mitarbeiter (1971) und Beardmore und Kelley (1972) beschrieben nach anfänglicher Hemmung des Enzyms durch Allopurinol einen Anstieg der Enzymaktivität, ohne daß dabei eine Änderung der renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin beobachtet wurde (4, 21). Neuere Untersuchungen von Gröbner und Kelley (1975) ergaben, daß der Anstieg der Enzymaktivität auf einer Enzymstabilisierung auf der Basis einer Änderung der Molekülgröße beruht (26).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist jedoch keine Aussage über den Einfluß der in dieser Arbeit verwendeten Nucleoside und des Nucleotids auf die Aktivität der ODC möglich.

4.3. Der Einfluß von Allopurinol auf Serumharnsäure, renale Harnsäure- und Oxypurinausscheidung sowie deren Beeinflussung durch oral verabreichtes Guanosin, Adenosin, Cytidin und Inosin-5-monophosphat.

Bereits 1970 zeigten Zöllner und Gröbner, daß Allopurinol die exogene und endogene Uratquote unterschiedlich beeinflußt.

In der vorliegenden Untersuchung kommt es unter purinfreier Kost und Zugabe von 400 mg Allopurinol pro Tag zu einem Absinken der endogenen Uratquote um durchschnittlich 41 %. Der Anstieg der Oxypurinausscheidung im Urin ersetzt dabei diesen Abfall nicht, so daß die Gesamtpurinausscheidung vermindert ist. Dieses "Defizit" in der Purinausscheidung wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben (20, 53, 54) und mit einer Hemmung der Purinsynthese de novo durch Allopurinol oder sich anhäufende Nucleotide erklärt. Spätere Untersuchungen in vitro zeigten, daß vor allem das Ribonucleotid von Allopurinol und die aus der Reutilisation von Hypoxanthin anfallenden Nucleotide Hemmstoffe der PRPP-Amidotransferase darstellen. Dieses Enzym ist für die Purinsynthese geschwindigkeitsbestimmend (10, 32, 41).

Zöllner und Gröbner (1970) wiesen in ihren Versuchen nach, daß die Harnsäurebildung aus exogenen Purinen durch Allopurinol vollständig unterdrückt wird (39). Allopurinol hemmt die Xanthinoxydase. Da dieses Enzym außer in der Leber nur noch in der Dünndarmmucosa vorkommt (68), erklärt man sich die quantitative Elimination der exogenen Uratquote durch eine Anreicherung von Allopurinol in der Dünndarmschleimhaut (39). Ob diese Verminderung der exogenen Uratquote durch die Ausscheidung entsprechender Mengen von Oxypurinen kompensiert wird, dürfte dann in erster Linie davon abhängen, ob diese Verbindungen, nachdem sie sich vor dem Mucosablock anhäufen, vornehmlich in das Interstitum mit anschließender Verteilung, auch in das Plasma, oder in das Darmlumen diffundieren.

In unseren Versuchsergebnissen zeigte sich, daß bei einer Belastung der Versuchspersonen mit Adenosin (3 g/die) oder Inosin-5-monophosphat (3 g/die) während Allopurinolgabe (400 mg/die) die Werte der Serumharnsäurekonzentration und der Urinharnsäure unterhalb der Werte der Kontrollperiode (Periode 1) liegen, was für eine quantitative Elimination der exogen zugeführten Purine durch Allopurinol spricht. Die erniedrigte renale Harnsäureausscheidung wird dabei bei beiden Versuchspersonen vollständig durch eine erhöhte Oxypurinausscheidung im Urin ersetzt. Man muß deshalb annehmen, daß in diesem Fall ein Großteil des in der Dünndarmmucosa entstehenden Hypoxanthins und Xanthins ins Interstitium und nicht ins Darmlumen abgegeben wird.

Ein davon abweichendes Verhalten zeigt sich bei Versuchsperson 1 unter Guanosinbelastung. Hier kommt es in Periode 3 nach Zugabe von Guanosin (3 g/die) zu einem Anstieg der renalen Harnsäureausscheidung um 166 %, während unter Adenosin- bzw. Inosin-5-monophosphat-Belastung der Anstieg nur 50 % betrug. Dabei liegen unter Guanosinbelastung und Allopurinolgabe die Werte der Serumharnsäurekonzentration und der Urinharnsäure deutlich über den Werten der Kontrollperiode, so daß in diesem Fall nur 44 % der exogenen Uratquote durch Allopurinol eliminiert wurde.

Die Verringerung der renalen Harnsäureausscheidung unter Allopurinol und Guanosin wird ebenfalls durch die erhöhte Oxypurinausscheidung vollständig ersetzt.

Der hohe Anstieg der Harnsäureausscheidung nach Guanosinbelastung gegenüber Adenosin und Inosin-5-monophosphat könnte entweder die Folge einer besseren Resorption von Guanosin im Dünndarm oder eines stärkeren Abbaues dieser Substanz sein. Das Verhältnis der Harnsäureausscheidung zur Oxypurinausscheidung unter Allopurinol beträgt während Guanosinbelastung 1:1, während Adenosinbelastung 1:2 und während Inosin-5-monophosphat-Belastung 1:1,5. Dieser Befund würde für einen schnelleren Abbau von Guanosin gegenüber den

anderen Substanzen sprechen. Da jeweils nur eine Normalperson untersucht wurde, besteht allerdings auch die Möglichkeit, daß es sich um Unterschiede handelt, die lediglich durch die individuelle Schwankungsbreite bei derartigen Untersuchungen zustande kommen. Rückschlüsse auf eine unterschiedliche Metabolisierung lassen sich aus diesen Untersuchungen nicht zwingend ableiten. Da im Falle von Adenosin und Inosin-5-monophosphat jeweils 4, bei Guanosin aber nur 3 Stoffwechselschritte bis zur Harnsäure führen, ist eine schnellere Metabolisierung von Guanosin theoretisch möglich.

Die Gesamtpurinausscheidung ist unter Guanosin höher als unter Adenosin und Inosin-5-monophosphat, was durch eine bessere Resorption von Guanosin erklärt werden kann.

Die relativ hohe Oxypurinausscheidung, die man unter Adenosinbelastung am Ende des Versuchs beobachtet, deutet auf einen langsamen Abbau dieser Substanz hin.

Gegenüber den Purinen Guanosin, Adenosin und Inosin-5-monophosphat zeigt die Zugabe des Pyrimidinnucleosids Cytidin keine Veränderung der Harnsäure- oder Oxypurinausscheidung. Das Pyrimidinnucleosid scheint demnach hier nicht, wie es umgekehrt der Fall ist, in die Purinbiosynthese oder den Purinabbau einzugreifen.

5. Literatur

1 Beardmore, T.D., Fox, I.H., Kelley, W.N.: Effect of allopurinol on pyrimidine metabolism in the Lesh-Nyhan-Syndrome.

Lancet 2, 830, 1970

2 Beardmore, T.D., Kelley, W.N.: Studies on the mechanism of allopurinol-induced inhibition of pyrimidine-metabolism.

Clin.Res. 19, 27, 1971 a

3 Beardmore, T.D., Kelley, W.N.: Mechanism of allopurinol-mediated inhibition of pyrimidine biosynthesis.

J. Lab. clin. Med. 78, 696, 1971 b

4 Beardmore, T.D., Cashman, J.S., Kelley, W.N.: Mechanism of allopurinol-mediated increase in enzyme activity in man.

J. clin. Invest. 51, 1823, 1972

5 Becroft, D.M.O., Philips, L.J.: Hereditary orotic aciduria and megaloblastic anaemia: A second case with response to uridine.

Brit.med. J. 1, 545, 1965

6 Becroft, D.M.O., Philips, L.J., Simmonds, A.: Hereditary orotic aciduria: Long-term therapy with uridine and a trial of uracil.

J. Pediat. 75, 885, 1969

7 Breher, B.O.: Der Einfluß von Purin- und Pyrimidinnukleotiden auf die durch Allopurinol induzierte Orotacidurie.

Dissertation, München 1980

8 Bresnick, E., Blatschford, K.:
Inhibition of dihydroorotase by purines and pyrimidines.

Biochem. Biophys. Acta 81, 150, 1964

9 Brockman, R.N., Chumley, S.W.:
Inhibition of formyl-glycinamide ribonucleotide synthesis in neoplastic cells by purines and analogs.

Biochem. Biophys. Acta 95, 365, 1965

10 Caskey, C.T., Ashton, D.M., Wyngaarden, J.B.:
Enzymology of feedback-inhibition of glutamine-phosphoribosyl-pyrophosphate amidotransferase by purinribonucleotides.

J. biol. Chem. 239, 2570, 1964

11 Changeux, J.P., Gerhart, J.C., Schachman, H.K.:
Allosteric interactions in aspartate transcarbamylase.
I. Binding of specific ligands to the native enzyme and its isolated subunits.

Biochemistry 7, 531, 1968

12 McCollister, R.J., Gilbert, W.R., Ashton, D.M., Wyngaarden, J.B.:
Pseudofeedback inhibition of purine synthesis by 6-mercaptopurine ribonucleotide and other purinanalogues.

J. biol. Chem. 239, 1560, 1964

13 Decker, K., Keppler D., Pausch, J.:
The regulation of pyrimidine nucleotide level and its role in experimental hepatitis.

Advanc. Enzyme Regulat. II, 205, 1973

14 Delbarre, F., Amor, B., Auscher, C., DeGery, A.:
Treatment of gout with allopurinol, a study of 106 cases.

Ann. rheum. Dis. 25, 627, 1966

15 Elion, G.B., Callahan, S., Nathan, H., Bieber, S., Rundles, R.W., Hitchings, G.H.: Potentiation by inhibition of drug degradation: 6-substituted purines and Xanthin-oxidase.

Biochem. Pharmacol. 12, 85, 1963

16 Elion, G.B.: Enzymatic and metabolic studies with allopurinol.

Ann. rheum. Dis. 25, 608, 1966

17 Fox, R.M., O'Sullivan, W.J., Firkin, B.G.: Orotic aciduria: differing enzyme patterns.

Amer. J. Med. 47, 332, 1969

18 Fox, R.M., Royse-Smith, D., O'Sullivan, W.J.:
Orotidinuria induced by allopurinol.

Science 168, 861, 1970

19 Fox, I.H., Wyngaarden, J.B., Kelley, W.N.:
Depletion of erythrocyte phosphoribosylpyrophosphate in man, a newly observed effect of allopurinol.

New. Engl. J.Med. 283, 1177, 1970

20 Fox, I., Kelley, W.N.:
Phosphoribosylpyrophosphate in man.
Biochemical and clinical significance.

Ann. intern. Med. 74, 424, 1971

21 Fox, R.M., Wood, M.H., O'Sullivan, W.J.:
Studies on the coordinate activity and lability of orotidylate phosphoribosyltransferase and decarboxylase in human erythrocytes, and the effects of allopurinol administration.

J. clin. Invest. 50, 1050, 1971

22 Gerhart, J.C., Pardee, A.B.:
The enzymology of control by feedback inhibition.

J. biol. Chem. 237, 891, 1962

23 Gots, J.S., Goldstein, J.:
Specific action of adenine as a feedback inhibitor of purine biosynthesis.

Science 130, 622, 1959

24 Gröbner, W., Berlin, M., Zöllner, N.: Der unterschiedliche Einfluß von Allopurinol auf die endogene und exogene Uratquote.

Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 76, 847, 1970

25 Gröbner, W., Zöllner, N.:
Störungen des menschlichen Pyrimidinstoffwechsels.

Münchn. Med. Wschr. 37, 117, 1975

26 Gröbner, W., Kelley, W.N.: Effect of allopurinol and its metabolic derivatives on the configuration of human crotate phosphoribosyltransferase and orotidine 5-phosphate-decarboxylase.

Biochem. Pharmacol. 24, 379, 1975

27 Gröbner, W., Zöllner, N.: The influence of dietary purines and pyrimidines on purine and pyrimidine biosyntheses in man.

Nutr. Metab. 21, 26, 1977

28 Hager, S.E., Jones, M.E.: Initial steps in pyrimidine synthesis in Ehrlich ascites carcinoma in vitro.

J. biol. Chem. 240, 4456, 1965

29 Hatfield, D., Wyngaarden, J.B.: 3-Ribosylpurines
II. Studies on (3-ribosylxanthine)-5-phosphate and on ribonucleotide derivatives of certain uracil analogs.

J. biol. Chem. 239, 2587, 1964 b

30 Herve, G.L. and Stark, G.R.:
Aspartate transcarbamylase. Aminoterminal analysis and peptide maps of the subunits.

Biochemistry 6 3743, 1967

31 Hitchings, G.H.: Effects of allopurinol in relation to purine biosynthesis.

Ann. rheum. Dis. 25, 601, 1966

32 Holmes, E.W., McDonald, J.A., McCord, J.M., Wyngaarden, J.B. and Kelley, W.N.:
Human glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase: Kinetic and regulatory properties.

J. biol. Chem. 248, 144, 1973

33 Hoogenraad, N.J., Levine, R.L., Kretchmer, N.:
Copurification of carbamylphosphate synthetase and aspartate transcarbamylase from mouse spleen.

Biochem. biophys. Res.Commun. 44, 981, 1971

34 Huguley, C.M., Brain, J.A., Rivers, S.L., Scoggins, R.B.:
Refractory megaloblastic anemia associated with excretion of orotic acid.

Blood, 14, 615, 1959

35 Ito, K., Nakanishi, S., Terade, M. and Tatibana M.:
Control of pyrimidine biosynthesis in mammalian tissues. Glutamine-utilizing carbamyl phosphate synthetase of various experiment tumors: Distribution, purification and characterisation.

Biochem. biophys. Acta 220, 477, 1970

36 Jones, M.E.: Regulation of pyrimidine and arginine biosynthesis in animals

Adv. Enzyme Regul. 9, 19, 1971

37 Kelley, W.N., Rosenbloom, F.M., Miller, J., Seegmüller, J.E.: An enzymatic basis for variation in response to allopurinol Hypoxanthin-guanine-phosphoribosyltransferase-deficiency.

New. Engl. J.Med. 278, 287, 1968

38 Kelley, W.N. and Beardmore, T.D.: Allopurinol: Alteration in pyrimidine metabolism in man.

Science, 169, 388, 1970

39 Kelley, W.N., Beardmore, T.D., Fox, J.H. and Meade, J.C.: Effect of allopurinol and oxipurinol on pyrimidine synthesis in cultured human fibroblasts.

Biochem. Pharmacol. 20, 1471, 1971

40 Kelley, W.N.: Purine and pyrimidine metabolism of cells in culture.
Growth, Nutrition and Metabolism in cells in culture.
Vol 1, 1972

Acad. Press. Inc. New York - London

41 Kelley, W.N., Gröbner, W., Holmes, E.: Current con epts in the pathogenesis of hyperuricemia

Metabolism, 22, 939, 1973

42 Kerson, L.A., Appel, S.H.:
Kinetic studies on rat liver carbamyl phosphate synthetase.

J. biol. Chem. 243, 4279, 1968

43 Klinenberg, J.R., Goldfinger, S.E. and Seegmiller, J.E.:
The effectiveness of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol in the treatment of gout.

Ann. intern. Med. 62, 639, 1965

44 Krenitzky, T.A., Elion G.B., Strelitz, R.A. and Hitchings, G.H.: Ribonucleosides of allopurinol and oxoallopurinol.

J. biol. Chem. 242, 2675, 1967

45 Lan, S.J., Sallach, H.J., Cohen, P.P.: The enzymatic steps of pyrimidine biosynthesis in the unfertilized frog egg.

Biochemistry 8, 3673, 1969

46 Levenberg, B.:
Role of L-glutamine as donor of carbamyl nitrogen for the enzymatic synthesis of citrulline in agricus bisporus.

J. biol. Chem. 237, 2590 - 8, 1962

47 Levin, B., Abraham, J.M., Oberholzer, V.G. and Burgess, E.A.:
Hyperammonaemia: a deficiency of liver ornithine transcarbamylase.

Arch. Dis. Childh. 44, 152, 1969

48 Levine, R.L., Hoogenrad, N.J., Kretchmer, N.:
Regulation of activity of carbamyl phosphate synthetase from mouse spleen.

Biochemistry 10, 3694, 1971

49 Löffler, G.:
Stoffwechsel der Purine und Pyrimidine, 13, in:
Physiologische Chemie, 1. Aufl. (Springer) Berlin

453 - 471, 1975

50 Mager, J.B., Magasanik:
Guanosine 5'-phosphate reductase and its role in the interconversion of purine nucleotides.

J. biol. Chem. 235, 1474, 1960

51 Matsuda, J., Arashima, S., Nambu, H.:
Hyperammonemia due to a mutant enzyme of ornithine transcarbamylase.

Pediatrics 48, 595, 1971

52 Monod, J., Changeux, J.B., Jakob, F.: Allosteric proteins and cellular control systems.

J. molec. Biol. 6, 306, 1963

53 Müller, M.M., Kaiser, E.:
Die Regulation des Purinstoffwechsels und seine medikamentöse Beeinflussung.

Dtsch. Med. Wschr., 100 (5), 198, 1975

54 Murray, A.W.: The biological significance of purine salvage.

Ann. Rev. Biochem. 40, 811, 1971

55 Nierlich, D.P., Magasanik, B.: Phosphoribosylglycinamide synthetase of Aerobacter aerogenes.

J. biol. Chem. 240, 366, 1965

56 Pomales, R., Bieber, S., Friedman, R., Hitchings, G.H.: Augmentation of incorporation of hypoxanthine into nucleic acids by administration of inhibitor of xanthin oxidase.

Biochim. biophys. Acta 72, 119, 1963

57 Pomales, R., Elion, G.B., Hitchings, G.H.: Xanthine as precursor of nucleic acid purines in mouse.

Biochim. biophys. Acta 95, 505, 1965

58 Reyes, P.: The synthesis of 5-fluoro-uridine-5-phosphate by a pyrimidine phosphoribosyltransferase of mammalian origin. I. Some properties of the enzyme from P1534J mouse leukemic cells.

Biochem. 8, 2057, 1969

59 Rogers, L.E., Porter, St.: Hereditary orotic aciduria II. A urinary screening test.

Pediatrics 42, 423, 1968

60 Rogers, L.E., Warford, L.R., Patterson, R.B. and Porter, F.S.: Hereditary orotic adiduria
I. A new case with Family studies.

Pediatrics 42, 415, 1968

61 Rundles, R.W., Wyngaarden, J.B., Hitchings, G.H., Elion, G.B., Silberman, H.R.: Effects of a xanthine oxidase inhibitor on thiopurine metabolism, hyperuricemia and gout.

Trans. Ass. amer. Physicians 76, 126, 1963

62 Rundles, R.W., Silberman, H.R., Hitchings, G.H. and Elion, G.B.: Effects of xanthine oxidase inhibitor on clinical manifestations and purine metabolism in gout.

Ann. intern. Med. 60, 717, 1964

63 Rundles, R.W.: Metabolic effects of allopurinol and alloxanthine.

Ann. rheum. Dis. 25, 615, 1966

64 Rundles, R.W., Metz, E.N. and Silberman, H.R.: Allopurinol in the treatment of gout.

Ann. intern. Med. 64, 229, 1966

65 Smith, L.H.Jr., Huguley, C.M.Jr., Brain, J.A.: Hereditary orotic aciduria. The metabolic basis of inherited disease third edition. Edited by J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, D.S. Fredrickson.

New York. McGraw-Hill Book Company 1003, 1972

66 Smith, L.H.Jr.: Pyrimidine metabolism in man.
New Engl.J.Med. 288, 764, 1973

67 Tatibana, M., Shigesada, K.: Activation by 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate of glutamine-dependent carbamyl phosphate synthetase from mouse spleen.
Biochem. biophys. Res.Commun. 46, 491, 1972

68 Watts, R.W.E., Watts, J.E.M., Seegmiller, J.E.: Xanthine oxidase activity in human tissues and its inhibition by allopurinol.
J.Lab. clin.Med. 66, 688 - 697, 1965

69 Wyngaarden, J.B., Ashton, D.M.: The regulation of activity of phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase by purine ribonucleotides: a potential feedback control of purine biosynthesis.
J. biol. Chem. 238, 1054, 1963

70 Wyngaarden, J.B., Greenland, R.A.: The inhibition of succinoadenylate kinosynthetase of Escherichia coli by adenosine and guanosine 5'monophosphates.
J. biol. Chem. 238, 1054, 1963

71 Wyngaarden, J.B., Rundles, R.W., Silberman, H.R. and Hunter, S.: Control of hyperuricemia with hydroxypyrazolopyrimidine, a purine analogue which inhibits uric acid synthesis.
Arthritis Rheum. 6, 306, 1963

72 Wyngaarden, J.B., Rundles, R.W. and Metz, E.N.:
Allopurinol in the treatment of gout.

Ann. intern. Med. 62, 842, 1965

73 Wyngaarden, J.B., Silberman, H.R., Sadler, J.H.:
Feedback mechanism influencing purine ribotide synthesis.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 75, 45, 1968

74 Yates, R.A., Pardee, A.B.:
Control of pyrimidine biosynthesis in Escherichia coli by a feedback mechanism.

J. biol. Chem. 221, 575, 1956

75 Zöllner, N., Schattenkirchner, M.:
Allopurinol in der Behandlung der Gicht und der Harnsäurenephrolithiasis.

Dtsch. med. Wschr. 92, 654, 1967

76 Zöllner, N., Gröbner, W.:
Der unterschiedliche Einfluß von Allopurinol auf die endogene und exogene Uratquote.

Europ. J. clin. Pharmacol. 4, 56, 1970

77 Zöllner, N., Gröbner, W.:
Influence of oral ribonucleid acid on orotaciduria due to allopurinol administration.

Z. ges. exp. Med. 156, 317, 1971

78 Zöllner, N., Janssen, A., Gröbner, W.:
Partielle Aufhebung der Allopurinol induzierten Orotacidurie durch Ribonucleotide.

Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 81, 1466, 1975

79 Zöllner, N., Gröbner, W.:
Der Einfluß verschiedener Purin- und Pyrimidinnucleoside auf die Pyrimidinsynthese des Menschen.

Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 84, 1129, 1978

6. Zusammenfassung:

Wir untersuchten, welchen Einfluß die Purinnucleoside Adenosin und Guanosin, das Purinnucleotid Inosin-5-monophosphat und das Pyrimidinnucleosid Cytidin auf die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie ausüben.

Gesunde junge Versuchspersonen erhielten über einen Zeitraum von 29 Tagen eine isoenergetische, purinfreie Formeldiät, die sich aus 55 Energieprozent Kohlenhydrate, 30 Energieprozent Fett und 15 Energieprozent Eiweiß zusammensetzte.

Täglich wurden im 24-Stunden-Urin Harnsäure, Oxypurine und Orotsäure bestimmt. Die Serumharnsäure sowie die Aktivität der Orotidyldecarboxylase im Erythrozyten wurden jeden zweiten Tag gemessen.

Nach einer kurzen Beobachtungszeit von 4 Tagen unter Formeldiät allein erhielten alle Versuchspersonen 10 Tage lang 400 mg Allopurinol in vier Einzelportionen. Anschließend wurde bei je einer Versuchsperson 3 g Adenosin, Guanosin, Inosin-5-monophosphat oder Cytidin zugelegt, wiederum über einen Zeitraum von 10 Tagen. Schließlich wurde Allopurinol abgesetzt und nur noch eines der genannten Nucleoside bzw. das Nucleotid gegeben.

Die Ergebnisse zeigen, daß Guanosin, Adenosin, Inosin-5-monophosphat und Cytidin die durch Allopurinol hervorgerufene renale Orotsäureausscheidung vermindern. Die Verringerung der Orotsäureausscheidung betrug unter Guanosin 36 %, unter Adenosin 30 %, unter Inosin-5-monophosphat 34 % und unter Cytidin 56 %.

Diese Ergebnisse lassen sich am ehesten damit erklären, daß die oben genannten Purine und das Pyrimidinnucleosid die Pyrimidinsynthese de novo hemmen. Als Angriffspunkte für diese Hemmung

werden dabei vor allem die Enzyme Carbamylphosphatsynthetase II (48) sowie Dihydroorotase (8) diskutiert.

Wie bereits in früheren Arbeiten festgestellt (4, 21, 26), zeigte sich auch hier unter Allopurinolzugabe ein Anstieg der Aktivität der ODC. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte jedoch keine Aussage über den Einfluß der in dieser Arbeit verwendeten Nucleoside und des Nucleotids auf die Aktivität der ODC gemacht werden.

Aufgrund der Bestimmung der Serumharnsäure sowie der Harnsäure- und Oxypurinausscheidung im Urin konnte der Einfluß von Allopurinol bzw. der verwendeten Purine und des Pyrimidinnucleosids auf den Purinstoffwechsel überprüft werden. Dabei zeigte sich bei sämtlichen Versuchspersonen unter alleiniger Gabe von 400 mg Allopurinol pro Tag ein Abfall der Serum- und Urinharnsäure um durchschnittlich 41 % sowie ein Anstieg der Oxypurinausscheidung im Urin, wobei jedoch dieser Oxypurinanstieg in keinem Fall den Harnsäureabfall kompensierte.

Im vorliegenden Versuch wurde nach Zugabe von Adenosin bzw. Inosin-5-monophosphat eine quantitative Elimination der exogenen Uratquote beobachtet, lediglich nach Zugabe von Guanosin wurde die exogene Uratquote durch Allopurinol nur um 44 % vermindert.
Erwartungsgemäß erbrachte die Verabreichung des Pyrimidinnucleosids Cytidin keine Beeinflussung der Harnsäure- bzw. Oxypurinausscheidung.

7. A n h a n g

Tabellen und Abbildungen

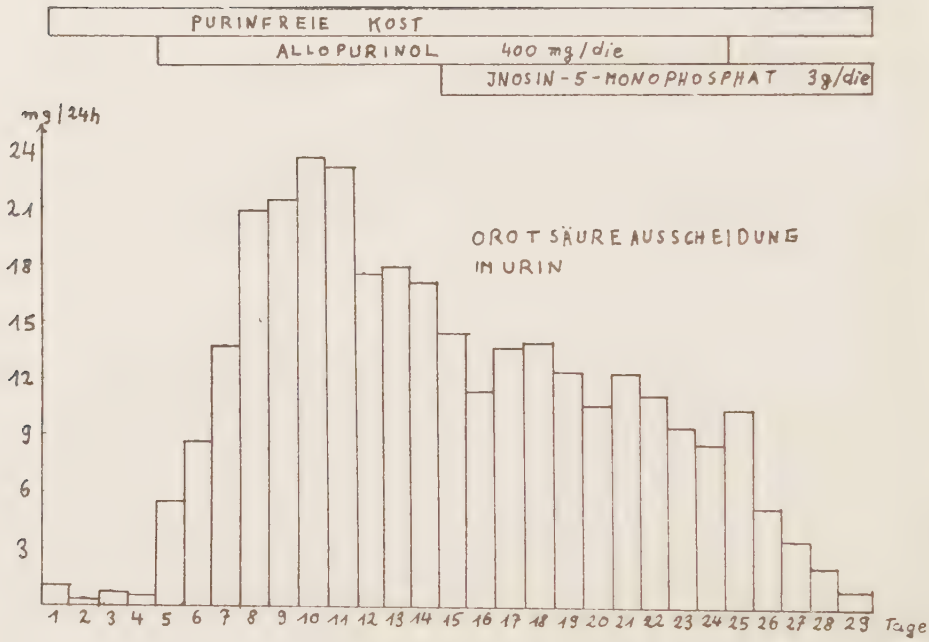


Abb. 11
Renale Tagesausscheidung von Gesamtorotsäure unter purinfreier Formeldiät und nach Zulage von Allopurinol, Allopurinol und Inosin-5-monophosphat sowie Inosin-5-monophosphat allein bei einer gesunden Versuchsperson.

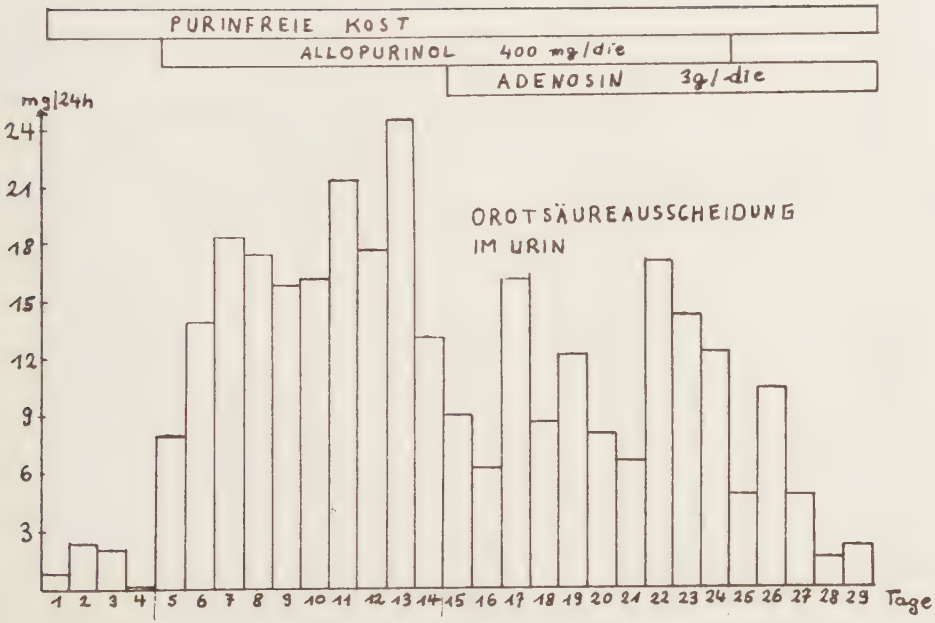


Abb. 12

Renale Tagesausscheidung von Gesamtorotsäure unter purinfreier Formeldiät und nach Zulage von Allopurinol, Allopurinol und Adenosin sowie Adenosin allein bei einer gesunden Versuchsperson.

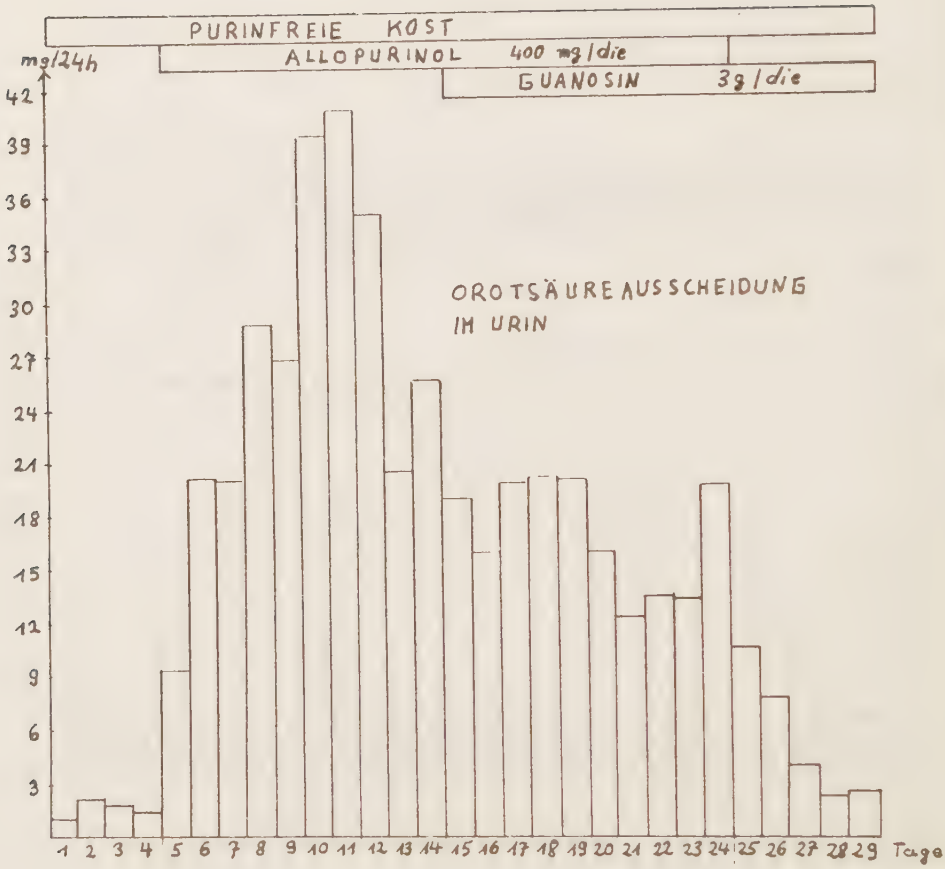


Abb. 13

Renale Tagesausscheidung von Gesamtorotsäure unter purinfreier Formeldiät und nach Zulage von Allopurinol, Allopurinol und Guanosin sowie Guanosin allein bei einer gesunden Versuchsperson.

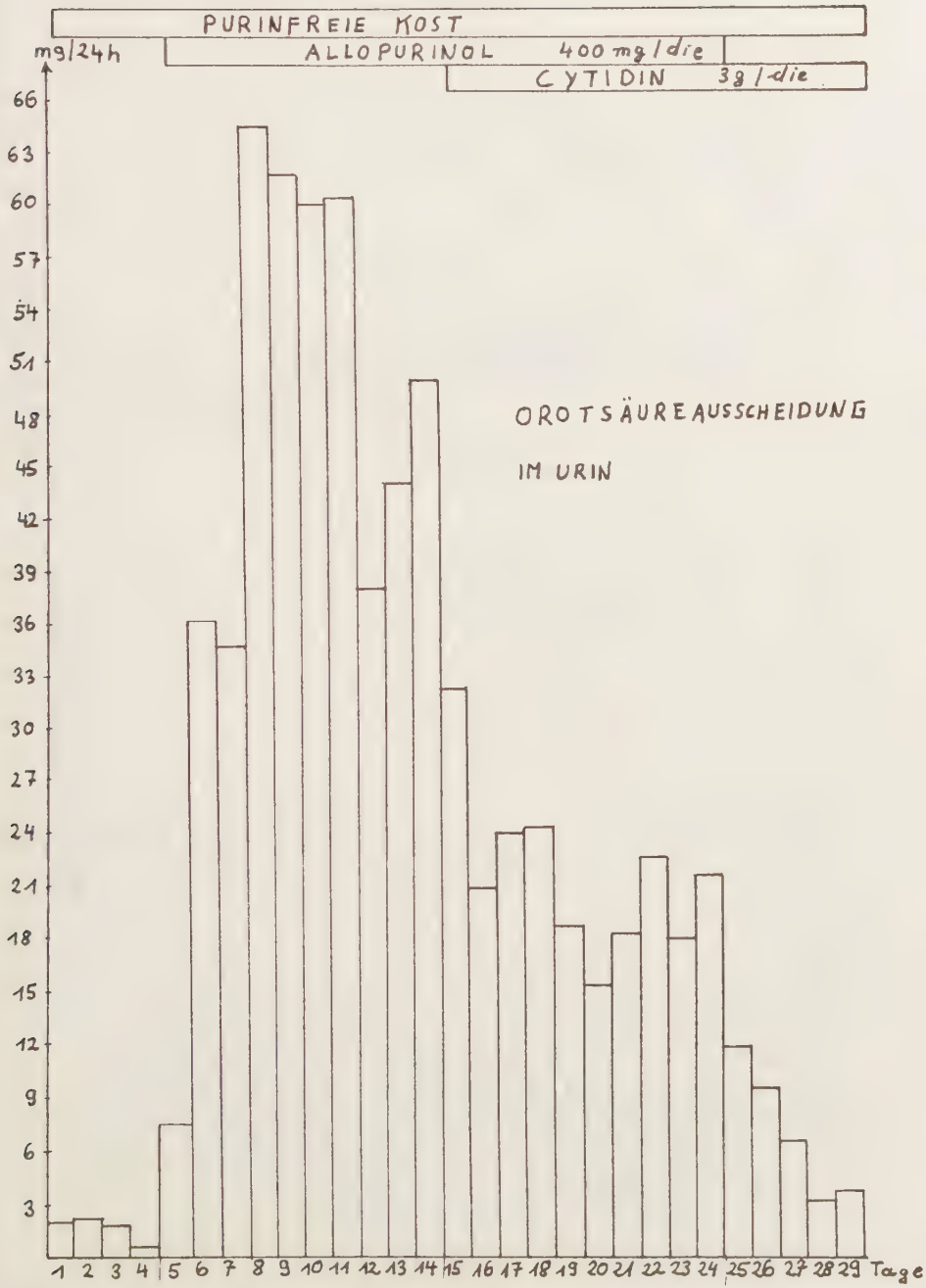


Abb. 14: Renale Tagesausscheidung von Gesamtorotsäure unter purinfreier Formeldiät und nach Zulage von Allopurinol, Allopurinol und Cytidin sowie Cytidin allein bei einer gesunden Versuchsperson.

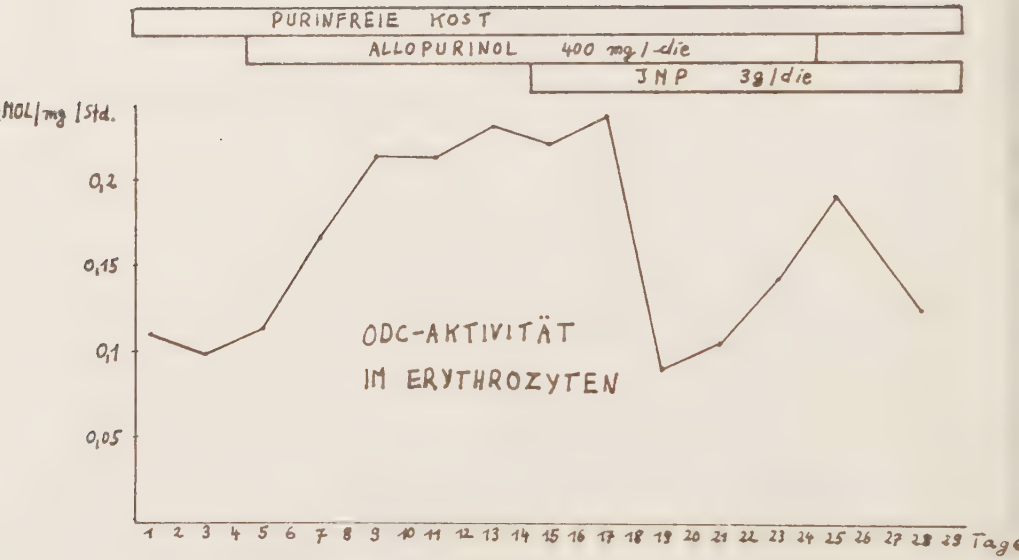


Abb. 15
Aktivität der Orotidyldecarboxylase im Erythrozyten unter purinfreier Formeldiät und nach Zulage von Allopurinol, Allopurinol und Inosin-5-monophosphat sowie Inosin-5-monophosphat allein bei einer gesunden Versuchsperson.

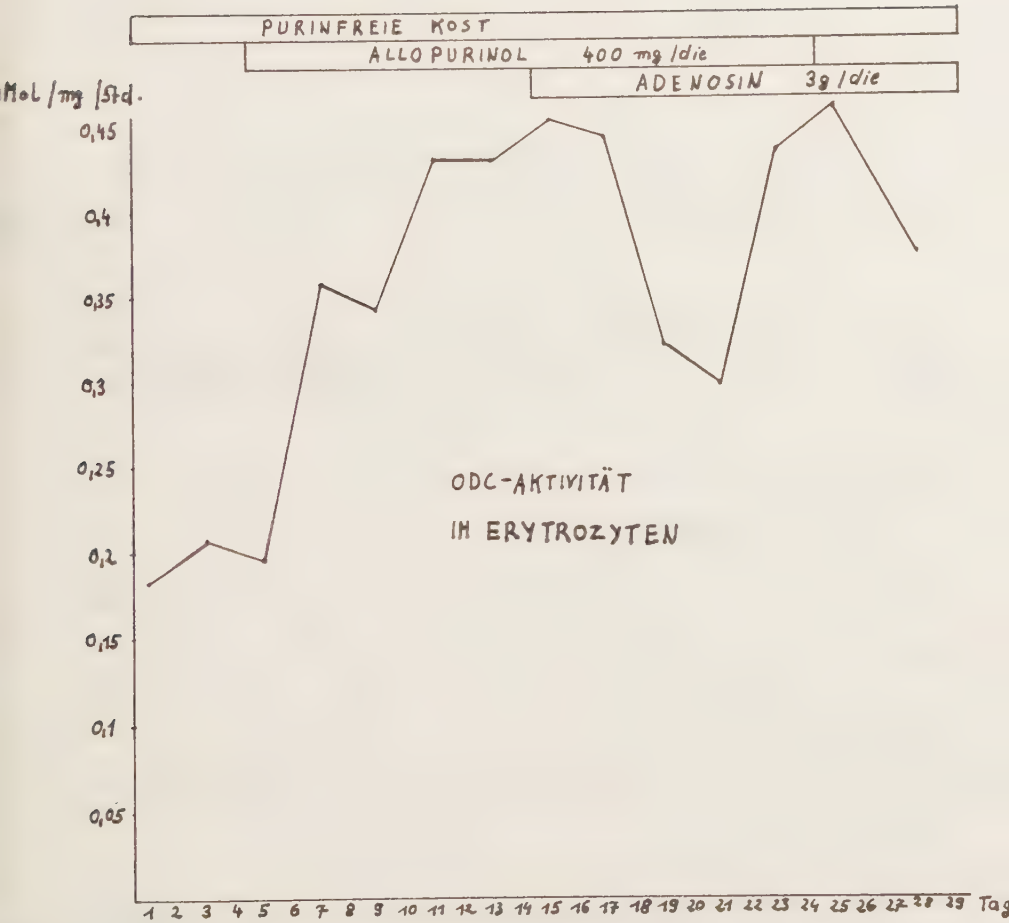


Abb. 16

Aktivität der Orotidyldecarboxylase im Erythrozyten unter purinfreier Formeldiät und nach Zulage von Allopurinol, Allopurinol und Adenosin sowie Adenosin allein bei einer gesunden Versuchsperson.

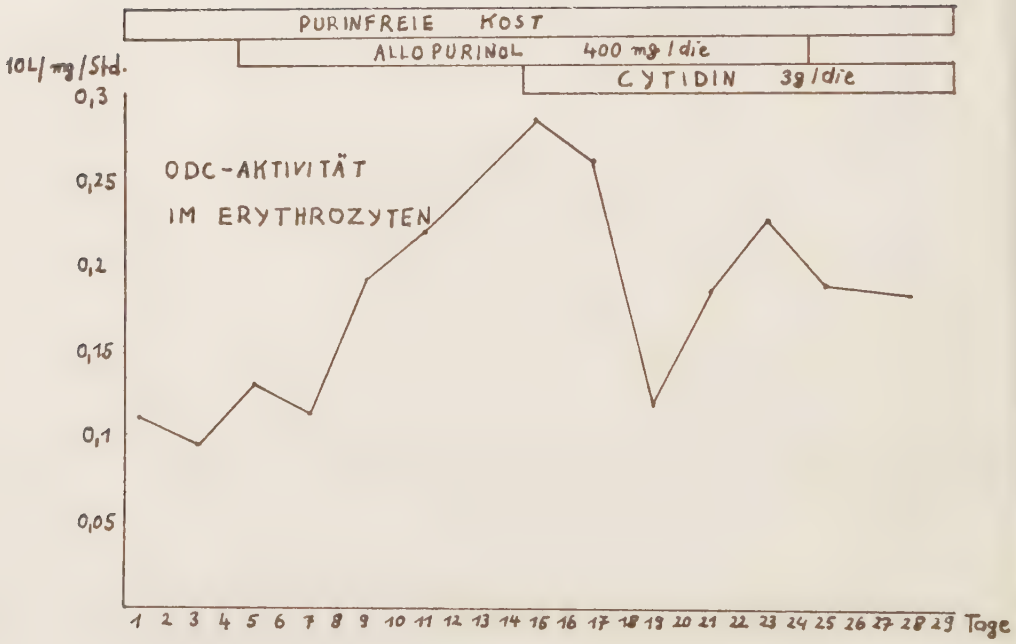


Abb. 17
Aktivität der Orotidyldecarboxylase im Erythrozyten unter purinfreier Formeldiät und nach Zulage von Allopurinol, Allopurinol und Cytidin sowie Cytidin allein bei einer gesunden Versuchsperson.

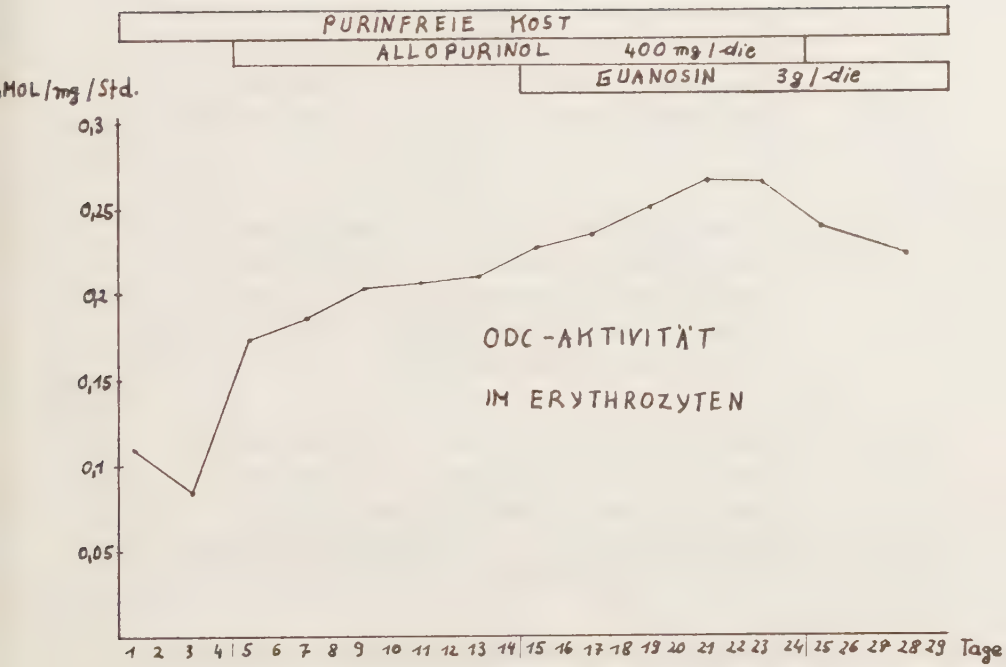


Abb. 18

Aktivität der Orotidyldecarboxylase im Erythrozyten unter purinfreier Formeldiät und nach Zulage von Allopurinol, Allopurinol und Guanosin sowie Guanosin allein bei einer gesunden Versuchsperson.

Legenden zu den Abbildungen 19 - 22

Abb. 19 Serumharnsäure und renale Tagesausscheidung von Harnsäure, Hypoxanthin und Xanthin sowie der Gesamtpurine unter purinfreier Formeldiät und nach Zulage von Allopurinol, Allopurinol und Inosin-5-monophosphat sowie Inosin-5-monophosphat allein bei einer gesunden Versuchsperson.

Abb. 20 Serumharnsäure und renale Tagesausscheidung von Harnsäure, Hypoxanthin und Xanthin sowie der Gesamtpurine unter purinfreier Formeldiät und nach Zulage von Allopurinol, Allopurinol und Adenosin sowie Adenosin allein bei einer gesunden Versuchsperson.

Abb. 21 Serumharnsäure und renale Tagesausscheidung von Harnsäure, Hypoxanthin und Xanthin sowie der Gesamtpurine unter purinfreier Formeldiät und nach Zulage von Allopurinol, Allopurinol und Guanosin sowie Guanosin allein bei einer gesunden Versuchsperson.

Abb. 22 Serumharnsäure und renale Tagesausscheidung von Harnsäure, Hypoxanthin und Xanthin sowie der Gesamtpurine unter purinfreier Formeldiät und nach Zulage von Allopurinol, Allopurinol und Cytidin sowie Cytidin allein bei einer gesunden Versuchsperson.

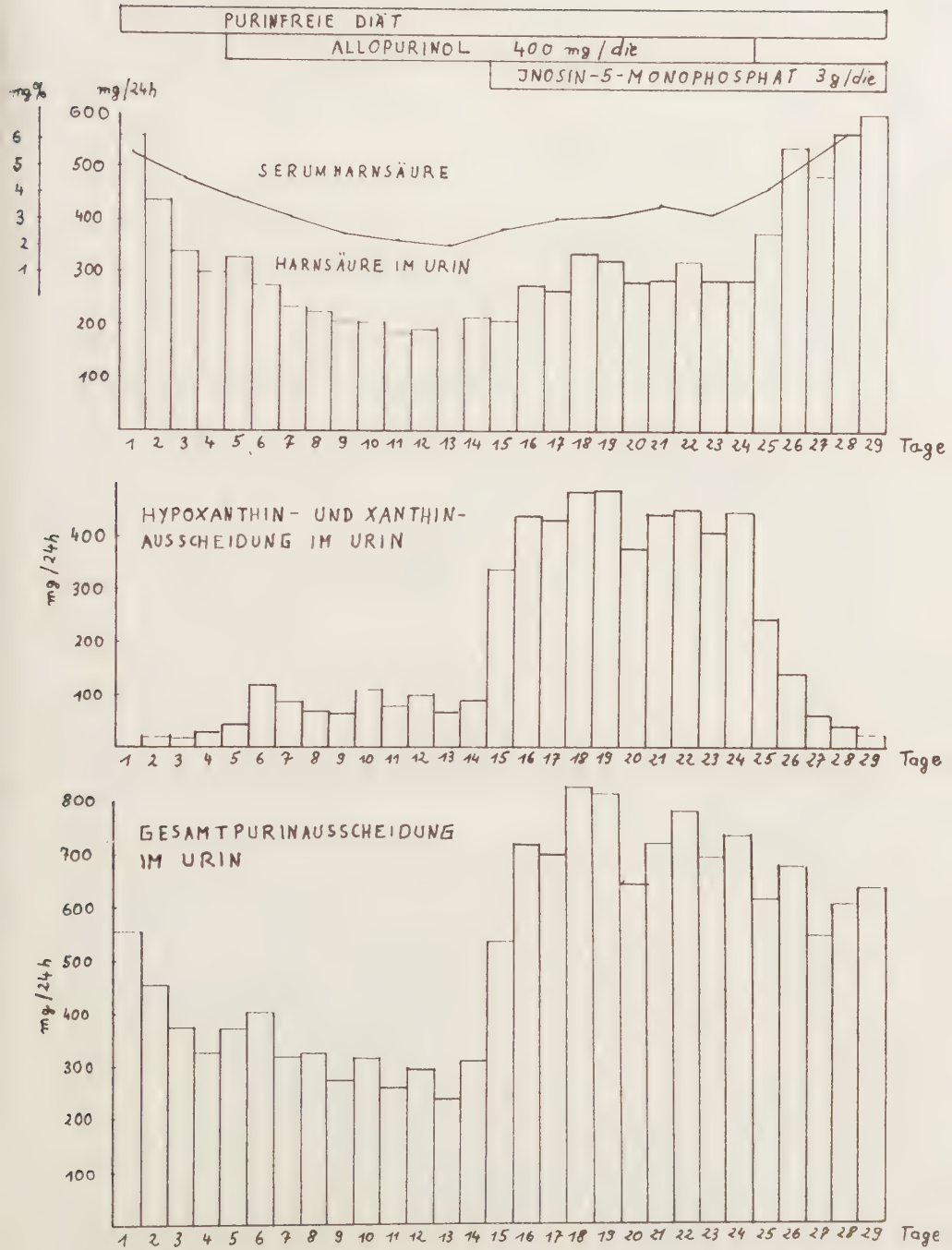
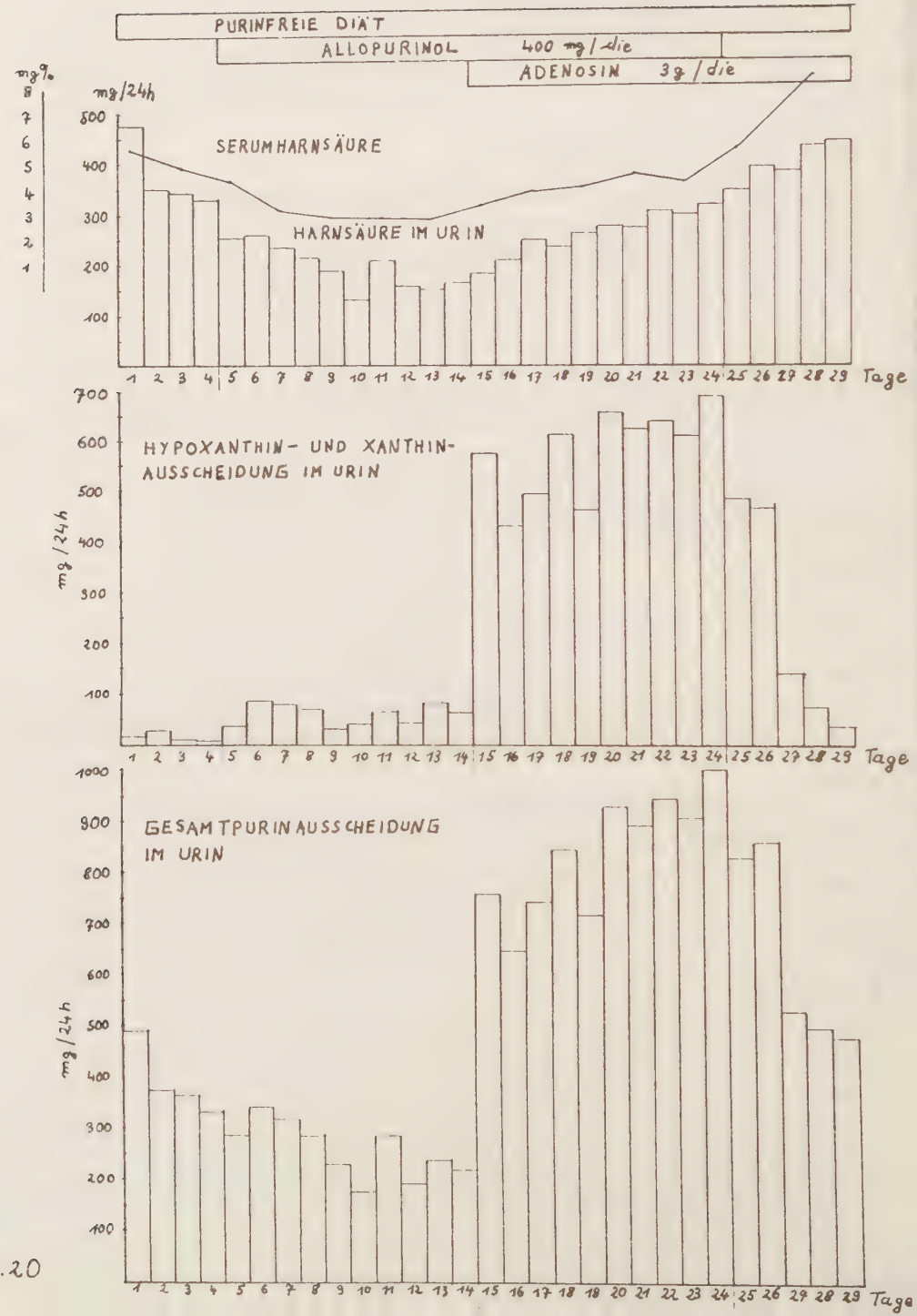
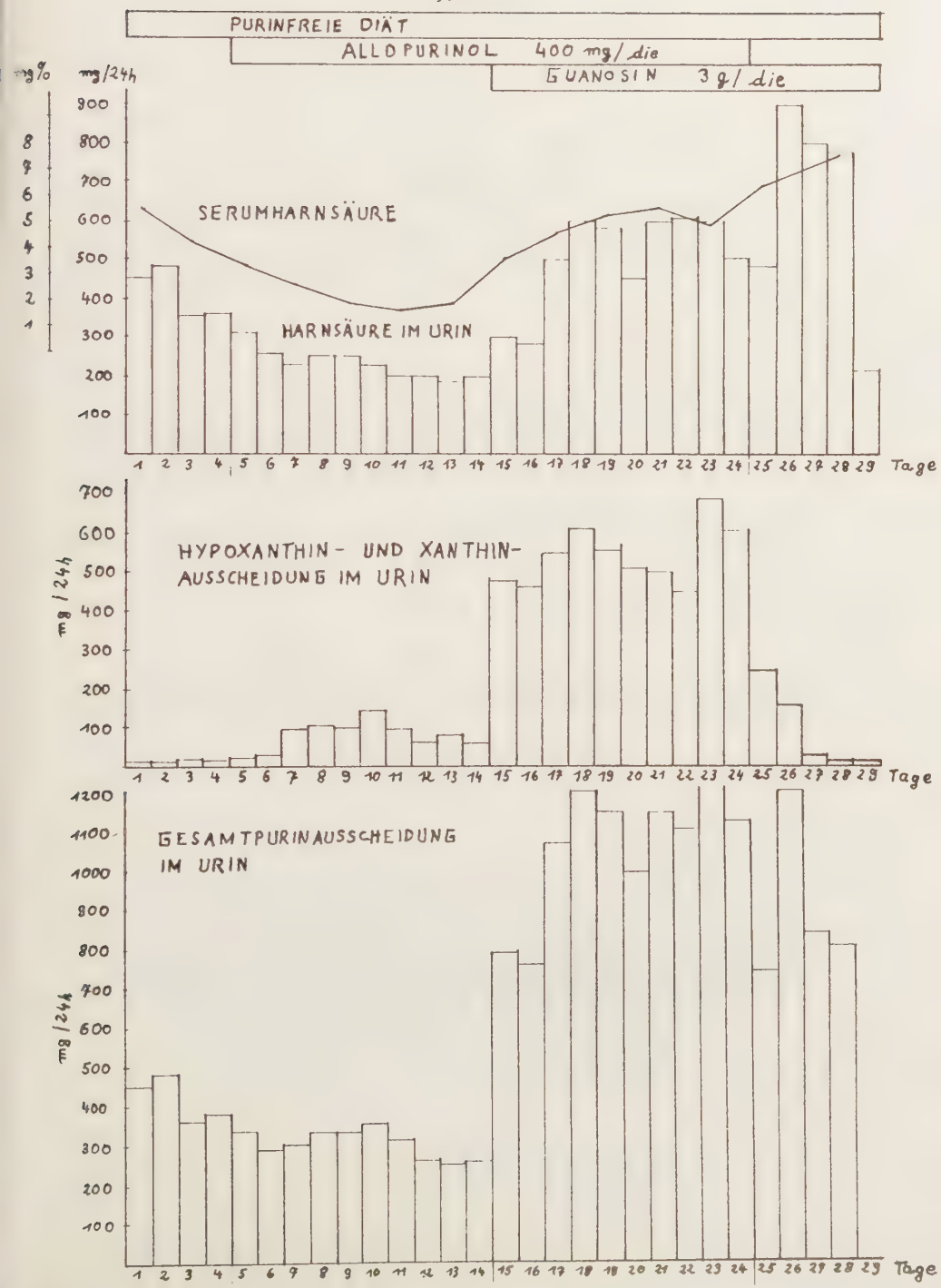

PURINFREIE DIÄT
ALLOPURINOL 400 mg / die
INOSIN-5-MONOPHOSPHAT 3 g/die
mg%
mg/24h
SERUMHARNSÄURE
HARNSÄURE IM URIN
Tage
HYPOXANTHIN- UND XANTHIN-AUSSCHEIDUNG IM URIN
mg/24h
Tage
GESAMTPURINAUSSCHEIDUNG IM URIN
mg/24h
Tage

Abb. 19


PURINFREIE DIÄT
ALLOPURINOL 400 mg/die
ADENOSIN 3 g/die
mg%
mg/24h
SERUMHARNSÄURE
HARNSÄURE IM URIN
Tage
HYPOXANTHIN- UND XANTHIN-AUSSCHEIDUNG IM URIN
mg/24h
Tage
GESAMTPURINAUSSCHEIDUNG IM URIN
mg/24h
Tage

.20


PURINFREIE DIÄT
ALLOPURINOL 400 mg/die
GUANOSIN 3 g/die
mg%
mg/24h
SERUMHARNSÄURE
HARNSÄURE IM URIN
Tage
HYPOXANTHIN- UND XANTHIN-AUSSCHEIDUNG IM URIN
mg/24h
Tage
GESAMTPURINAUSSCHEIDUNG IM URIN
mg/24h
Tage

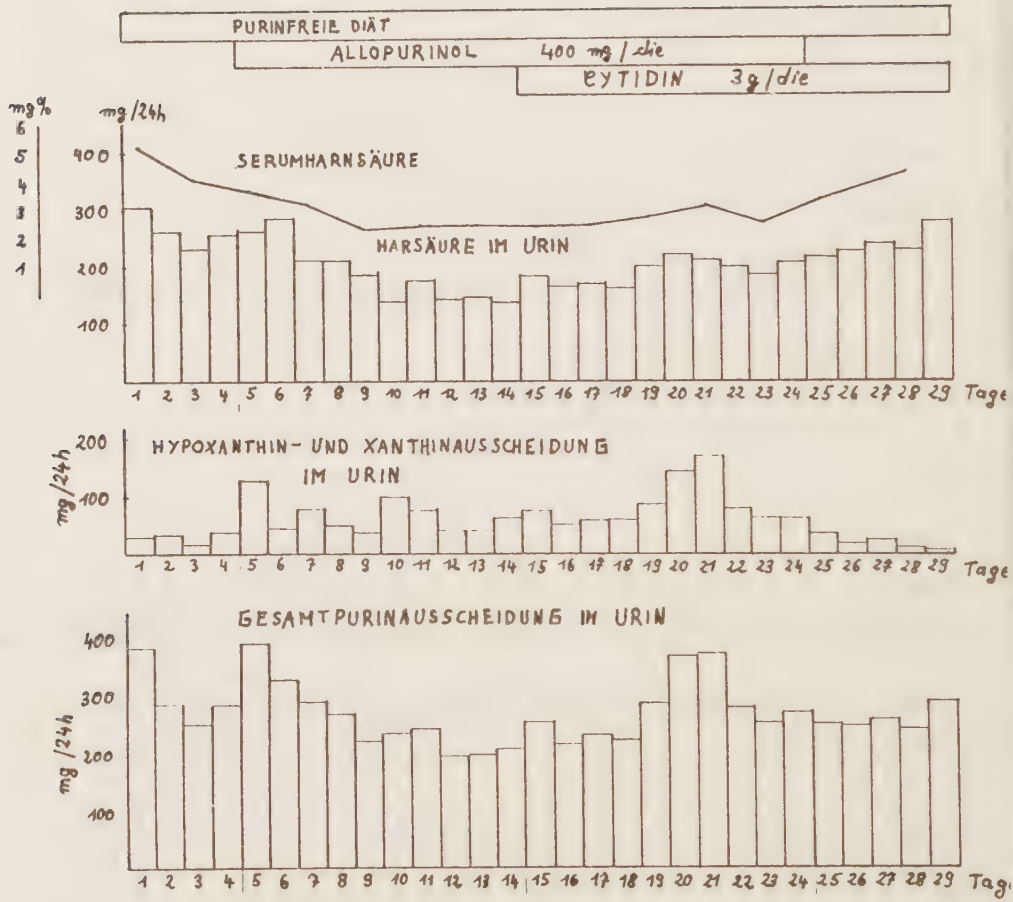

PURINFREIE DIÄT
ALLOPURINOL 400 mg / die
CYTIDIN 3g / die
mg%
mg/24h
SERUMHARNSÄURE
HARSÄURE IM URIN
Tage
HYPOXANTHIN- UND XANTHINAUSSCHEIDUNG IM URIN
mg/24h
Tage
GESAMTPURINAUSSCHEIDUNG IM URIN
mg/24h
Tage

Abb. 22

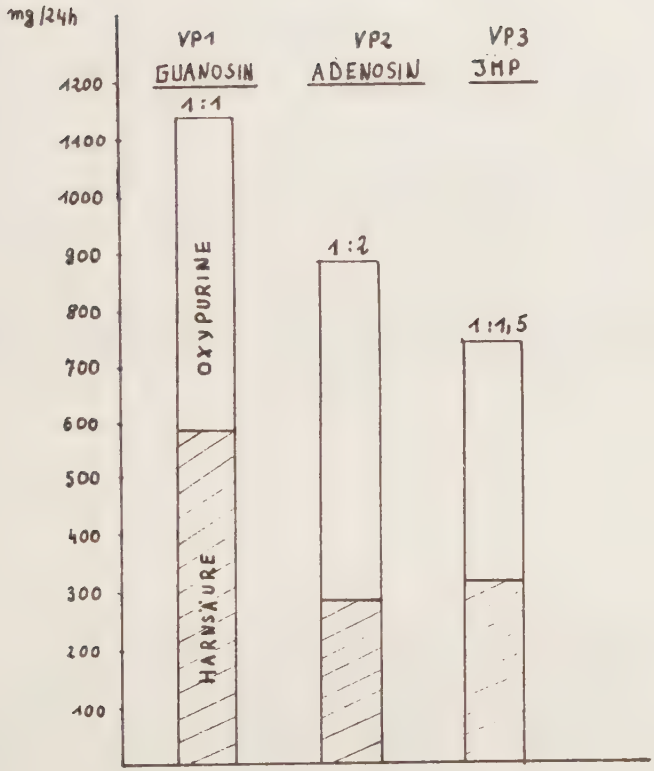


ABB. 23 VERHÄLTNIS DER HARNSÄURE - ZUR OXYPURINAUSSCHEIDUNG BEI DEN VERSUCHSPERSONEN 1-3 UNTER ALLOPURINOL UND PURINBELASTUNG (PERIODE 3) NACH ERREICHEN EINES GLEICHGEWICHTS DER UNTERSUCHTEN MESSGRÖSSEN.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
	PURINFREIE KOST																												
					ALLOPURINOL 400 mg / die																								
															JMP 3 g / die														
VERSUCHSTAGE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
HARNSÄURE URIN mg/24h	553	41,0	342	299	325	275	231	253	208	205	182	189	176	213	209	271	263	339	325	273	279	3[illegible]3	[illegible]	281	366	[illegible]	183	260	6,03
HARNSÄURE SERUM mg%	5,45		4,55		3,9		3,05		2,45		2,25		2,05		2,05		3,0		3,05		3,5		3,15		4,2			4,3	
OXYPURINE URIN mg/24h	0	16	14	27	42	124	92	66	62	105	76	98	59	92	331	140	431	481	483	369	440	450	408	445	144	116	[illegible]	39	19
OROTSÄURE URIN mg/24h	1,0	0,4	0,7	0,4	5,4	6,9	13,6	20,9	21,1	22,7	23,4	17,7	17,8	17	13,8	11	13,4	13,7	12,2	10,5	12,1	11	9,2	8,6	10,2	4,8	3,2	1,6	1,0
ODC-AKTIVITÄT nMOL/mg/Std.	0,110		0,098		0,116		0,166		0,217		0,216		0,217		0,220		0,234		0,090		0,106		0,142		0,185			0,123	
24h-URIN VOLUMEN ml	1110	1008	1170	835	1220	1110	1050	1100	945	1080	1020	960	990	960	870	950	990	1065	1015	910	1100	1130	920	955	1220	960	800	990	885

TAB. 6 MESSWERTE DER VERSUCHSPERSON 3 (JMP)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
	PURINFREIE KOST																												
					ALLOPURINOL 400 mg / die																								
															CYTIDIN 3 g / die														
VERSUCHSTAGE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
HARNSÄURE URIN mg/24h	361	264	233	256	265	280	215	215	186	135	173	148	150	144	182	166	172	164	202	210	213	200	185	205	215	226	227	225	275
HARNSÄURE SERUM mg%	5,2		4,05		3,75		3,1		2,3		2,35		2,35		2,1		2,45		2,75		3,05		2,8		3,3			4,1	
OXYPURINE URIN mg/24h	24	27	16	33	128	45	75	51	33	99	73	45	45	60	10	57	57	60	87	111	173	76	64	59	34	[illegible]	[illegible]	71	9
OROTSÄURE URIN mg/24h	1,8	1,8	1,6	0,6	7,2	26	34,8	64,2	62,2	60	60	38,2	44	49,6	[illegible]	10,4	[illegible]	24,2	15,2	15	17,8	22,2	17,4	21	11	9	6	2,8	1,9
ODC-AKTIVITÄT nMOL/mg/Std.	0,109		0,095		0,130		0,113		0,192		0,217				0,285		0,253		0,117		0,179		0,213		0,182			0,197	
24h-URIN VOLUMEN ml	1720	2245	1640	1190	1395	2245	980	1510	1020	1415	1930	1060	1400	1985	1460	1280	820	1315	1010	1000	1220	1310	1070	1960	840	1590	930	1060	840

TAB. 7 MESSWERTE DER VERSUCHSPERSON 4 (CYTIDIN)

	PUR-VERSUCH MOST																													
	ALLOPURINOL 300 mg/d																													
	GUANOSIN 3g/d																													
VERSUCHSTAGE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
HARNSÄURE URIN mg/24h	447	471	344	350	312	261	221	211	252	223	209	205	180	201	304	284	517	604	585	471	621	651	502	474	524	512	511	511	511	511
HARNSÄURE SERUM mg%	2,8		4,05		3,2		2,55	1,9		1,55		1,95			3,55		4,5		5,2		5,4		4,9	6,2				4,5		
OXYPURINE URIN mg/24h	0	0	0	0	10	27	80	86	84	130	100	66	72	52	476	465	541	613	557	516	508	416	686	257	114	71	29	10	0	
OROTSÄURE URIN mg/24h	1,2	2,4	2,0	1,6	9,2	20	14,8	2,86	27	39,4	10,8	3,5	20	25	19	15,8	15,6	20	19,6	16	12	13	20	13	7,7	2,8	1,8	0,219	2	
ODC-AKTIVITÄT nMOL/mg/Std.	0,109		0,086		0,122		0,186		0,206		0,208		0,212		0,225		0,229		0,235		0,268		0,267	0,239						
24h-URIN VOLUMEN ml	1690	1585	1900	860	1670	1330	890	1140	1050	955	1340	1220	900	850	1370	1175	1375	1510	1400	1360	1200	1520	1675	1610	1355	1830	1560	1715	1465	

TAB. 8 MESSWERTE DER VERSUCHSPERSON 1 (GUANOSIN)

	PUR-VERSUCH MOST																													
	ALLOPURINOL 400 mg/die																													
	ADENOSIN 3g/d																													
VERSUCHSTAGE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
HARNSÄURE URIN mg/24h	474	350	348	332	252	255	240	210	190	132	208	158	150	161	185	213	250	235	258	268	269	305	300	375	348	313	370	430	445	
HARNSÄURE SERUM mg%	5,6		4,95		4,3		3,1		2,95		2,95		2,9		3,35		3,9		1,0		1,45		4,1		5,5			8,3		
OXYPURINE URIN mg/24h	14	22	10	5	31	88	50	70	35	40	69	43	83	58	56,8	427	491	606	620	653	620	637	603	690	475	463	413	69	48	
OROTSÄURE URIN mg/24h	1	2,2	2		7,8	13,6	16,2	17,4	16,3	16,6	21,4	17,9	23,5	23	9	6,2	16,2	8,9	11,4	8,5	7	17	14,2	12,5	4,8	13,6	4,8	1,6	2	
ODC-AKTIVITÄT nMOL/mg/Std.	0,182		0,209		0,194		0,363		0,329		0,430		0,428		0,456		0,443		0,321		0,299		0,436		0,463			0,324		
24h-URIN VOLUMEN ml	1720	1095	1290	780	820	940	960	725	670	575	650	1190	550	550	725	520	835	770	1165	710	515	920	950	760	690	1720	710	700	820	

TAB. 9 MESSWERTE DER VERSUCHSPERSON 2 (ADENOSIN)

TAB. 10 SERUMHARNSÄURESPIEGEL, RENALE HARNSÄURE-, OXYPURIN- UND OROTSÄUREAUSSCHEIDUNG DER VERSUCHSPERSONEN 1-4 AM ENDE DER EINZELNEN VERSUCHSABSCHNITTE.

	PURINFREIE KOST															
					ALLOPURINOL 400 mg/die				ALLOPURINOL 400 mg/die				GUANOSIN 3g/die	ADENOSIN 3g/die	IMP 3g/die	CYTIDIN 3g/die
									+ 3g GUANOSIN	+ 3g ADENOSIN	+ 3g IMP	+ 3g CYTIDIN				
	V_1	V_2	V_3	V_4	V_1	V_2	V_3	V_4	V_1	V_2	V_3	V_4	V_1	V_2	V_3	V_4
SERUMHARNSÄURE (mg %)	4.05	4.95	4.55	4.05	1.8	2.93	2.25	2.33	5.17	4.18	3.20	2.80	7.65	8.30	6.30	4.10
RENALE HS-AUSSCHEIDUNG (mg/24h)	347	340	320	244	218	173	203	185	582	278	309	198	770	418	549	249
OXYPURIN-AUSSCHEIDUNG IM URIN (mg/24h)	0	7	20	24	84	57	79	58	562	607	439	94	12	80	39	22
OROTSÄURE-AUSSCHEIDUNG IM URIN (mg/24h)	2	1	2	2	25,8	18,3	20	54	16,6	12,8	11,4	23,7	2	2	1	3

Josef Reisinger
Lindacher Str.25
7070 Schwäbisch Gmünd

Tabellarischer Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name:	Reisinger Josef
Geburtsdatum:	13.Februar 1952 in Rosenheim
Staatsang.:	deutsch
Familienstand:	verheiratet
Eltern:	Reisinger Josef,wohnhaft in Brannenburg Beruf:Wagnermeister Reisinger Erna,geb.Dorn Beruf:Hausfrau
Schulbildung:	1958 - 1963 Volksschule Brannenburg 1963 - 1972 Finsterwaldergymnasium Rosenheim 1972 Abitur
Studium:	1972 Beginn des Studiums der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München 1975 Ärztliche Vorprüfung 1976 1.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 1978 2.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 1978/79 Praktisches Jahr: Chirurgie: Prof.Grill/Starnberg Neurologie: Prof.Schrader/Großhadern Innere: Prof.Zöllner/Poliklinik 1979 Staatsexamen und Approbation 1977-1980 Dissertation bei Prof.Zöllner an der Poliklinik Thema: Pyrimidin- und Purinstoffwechsel
Berufsweg:	November 1979 bis Januar 1981 Truppenarzt bei der Luftwaffensanitätsstaffel in Kaufbeuren Februar 1981 bis Januar 1982 Assistentenstell im Landeskrankenhaus für Psychiatrie und Neurologie in Kaufbeuren Seit Februar 1982 Assistentenstelle in der Abteilung für Innere Medizin im Kreiskrankenhaus Schwäbisch-Gmünd.

Schwäbisch-Gmünd, im März 1985